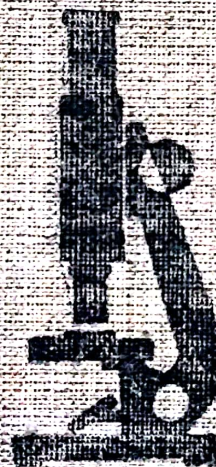
E. Oneț
Virginia Constantinescu

Diagnosticul de laborator în medicina veterinară



EMIL ONEȚ
Doctor în medicină veterinară

VIRGINIA CONSTANTINESCU
Doctor în medicină veterinară

Diagnosticul de laborator în medicina veterinară



Cuprins

75—47

Scanned with OKEN Scanner

Contents

Introducere

Utilizarea metodelor de laborator în diagnosticul diferitelor stări de boală la animale a apărut odată cu descoperirea primelor metode bacteriologice, serologice, virusologice, histopatologice, hematologice, biochimice, capabile să pună în evidență tulburări intime, nedecelabile prin mijloacele de investigație clinică și anatomopatologică. Ea a presupus o îndelungată muncă de cercetare a stărilor fiziologice și apoi a modificărilor ce se instalează în cursul stărilor de boală. Se poate spune că punctul de plecare l-a constituit cunoașterea limitelor fiziologice de variație a funcțiilor și structurilor organice, pe baza cărora s-a pornit la studierea deviațiilor care intervin în cursul proceselor patologice.

Utilizarea metodelor de laborator este legată de toate marile descoperiri realizate în decursul timpului în materie de biologie, medicină, chimie și alte domenii de graniță.

Printre primele procedee de laborator folosite în scop de diagnostic, este examenul bacterioscopic. Examinarea diferitelor produse patologice de la indivizii bolnavi și evidențierea agenților etiologici au constituit baza diagnosticului de certitudine într-o serie de boli infecțioase și parazitare și, pentru unele, o mai constituie și azi. Astfel, examenul frotiurilor de sînge, cu evidențierea paraziților în hemosporidiozele animalelor sau a ouălor de paraziți în helmintozele gastrointestinale, evidențierea germenilor în sînge, în cazul bolilor septicemice sau în diferite țesuturi și organe, în secreții și excreții, în exsudate și transsudate, reprezintă și azi procedee ajutătoare, fără de care nu se poate concepe un diagnostic etiologic sigur.

Există o serie de boli în care conflictul activ între macro- și microorganisme se soldează cu apariția anticorpilor specifici aglutinanți, precipitanți, fixatori de complement, floculanți etc., a căror punere în evidență este de o hotărîtoare importanță, atît pentru precizarea diagnosticului individual, cît și pentru depistarea animalelor cu forme incipiente sau inaparente clinic. Eliminarea unor asemenea exemplare din efective este cu atît mai importantă, cu cît ele reprezintă, în marea majoritate, pericole iminente, datorită faptului că sînt eliminatoare de germeni patogeni pentru celelalte animale. Astfel se poate aminti bruceloza, leptospiroza, morva, durina, tifopuloroza care-și bazează măsurile de eradicare în bună măsură pe aplicarea reacțiilor serologice.

În unele dintre aceste boli, semnele clinice prezentate de animale în cursul vieții sau modificările anatomopatologice constatate după moarte

sau sacrificare sînt cu totul necaracteristice sau incomplete, astfel încît numai pe baza lor nu se poate stabili un diagnostic de precizie. În asemenea cazuri reacţiile serologice sînt menite să elucideze situaţia.

În alte cazuri, în cursul lucrărilor de laborator, izolarea unor germeni sau virusuri necesită, pentru identificarea lor exactă, de asemenea, unele reacţii serologice. Astfel, în infecţiile salmonelice, colibacilare, leptospirice, precizarea tipului infectant se bazează în mare măsură pe reacţiile serologice, de aglutinare. Pseudopesta aviară, pesta porcină, infecţiile cu adenovirusuri la bovine, infecţiile cu virusul parainfluenţei la bovine şi porcine şi altele, îşi bazează identificarea agenţilor respectivi pe reacţii de hemaglutinare şi inhibare a aglutinării, pe seroneutralizări etc.

În alte boli, se instalează modificări sanguine a căror precizare permite atît stabilirea diagnosticului, cît şi orientarea măsurilor terapeutico-profilactice. Astfel, în stările de anemie, cauzate de tulburări la nivelul sistemului hematopoetic, procese septice, stările hemolitice cauzate de arsuri, substanţe toxice anorganice (nitriţi şi nitraţi, plumb), organice (anilină, nitrotoluen, fenilhidrazidă, sulfapiridină) sau toxine hemolitice (veninul de şarpe, ciuperci otrăvitoare), stabilirea gradului de anemie, coroborată cu celelalte date clinice, anamnetice şi eventual anatomopatologice, permite orientarea spre cauzele care au generat procesul patologic şi implicit eliminarea lor.

În leucoză, la diferite specii, se instalează o serie de modificări cantitative şi calitative ale elementelor figurate sanguine, a căror interpretare constituie criterii de diagnostic deosebit de utile, uneori hotărîtoare. Existenţa unui număr crescut din unele componente celulare, cuplată cu evidenţierea formelor tinere, anormale sau în mitoză, sînt modificări extrem de importante pentru diagnostic.

În multe stări de boală tulburările ce se instalează nu au gradul de specificitate care să permită stabilirea unui diagnostic etiologic. Aşa de exemplu, enteritele tineretului la toate speciile pot fi provocate de agenţi foarte variaţi, de natură bacteriană, virală, parazitară, alimentară, mecanică etc., şi îmbracă, din punct de vedere simptomatologic, aspecte care sînt foarte asemănătoare. În asemenea cazuri, numai identificarea factorului cauzal este în măsură să permită luarea unor măsuri terapeutice şi profilactice corespunzătoare. Izolarea agentului etiologic permite, în acelaşi timp, să se acţioneze adecvat şi cu cele mai potrivite mijloace terapeutice. Astfel, în cazul infecţiilor colibacilare, streptococice, pasteurelice, pe lîngă faptul că izolînd germenii respectivi se cunoaşte cauza, prin stabilirea cu ajutorul antibiogramei a spectrului lor de sensibilitate faţă de antibiotice şi bacteriostatice, se poate acţiona în mod eficient pentru tratarea cazurilor de boală şi pentru prevenirea apariţiei de noi îmbolnăviri la animalele expuse. Faptul este cu atît mai important, cu cît la ora actuală o serie din infecţiile foarte frecvente atît la tineret, cît şi la adulţi (enterite, pneumopatii, metrite, mamite, meningite) sînt provocate de germeni care nu sînt sensibili faţă de antibiotice de uz larg, astfel încît utilizarea acestora s-ar solda cu cheltuieli inutile şi ar fi ineficace. Există de exemplu, cazuri frecvente de colibaciloză la viţei în care tulpinile ce acţionează într-un focar dovedesc sensibilitate faţă de un singur antibiotic.

Există entități morbide care se traduc prin alterații tisulare, a căror specificitate poate fi precizată numai printr-un examen histopatologic. Într-o serie dintre ele, modificările ce se produc sînt atît de caracteristice încît au cea mai importantă valoare diagnostică. Este suficient să ne gîndim la existența corpusculilor Babeș-Negri din turbare, la incluziile variolice, la granulomul tuberculos și morvos, la incluziile Seifried din laringotraheita infecțioasă, la celulele tumorale din diferite focare neoplazice, la hemosideroza hepatică din anemia infecțioasă a calului etc.

În unele stări de intoxicație (cu sare, cu substanțe insecticide și cu alte toxice de diferite origini) examenul de laborator este cel care permite elucidarea situației.

În stările de carență, atît de dăunătoare mai ales în condițiile creșterii animalelor în mari complexe industriale, determinarea tipului carențial este uneori imposibilă fără aplicarea unor examene de laborator. Carențele în oligoelemente, săruri minerale, vitamine, aminoacizi pot fi stabilite precis numai prin dozări de laborator.

Și diagnosticul unor stări fiziologice sau patologice de domeniu obstetrical se bazează pe mijloace de laborator. Este suficient în acest sens să amintim diagnosticul precoce al gestației și cel al mamitelor, ambele atît de importante pentru practica actuală.

Există desigur și procedee de laborator de mare finețe și foarte pretențioase din punct de vedere tehnic, cum ar fi examenele de imunofluorescență, electroforetice, electrono-microscopice, care se încadrează tot în acest context, dar care presupun desigur o pregătire de specialitate foarte atentă și, adesea, o îndelungată experiență, care vizează abordarea procedeelor celor mai importante și uzuale aplicabile la ora actuală în condițiile dotării materiale din laboratoarele veterinare.

Trebuie subliniat totodată că în concepția medicului veterinar actual trebuie să existe o viziune de ansamblu a fenomenelor biologice. Prin pregătirea sa profesională, medicul veterinar este un biolog care trebuie să înțeleagă și să interpreteze procesele în fața cărora este pus. El este chemat, ca urmare, să coroboreze toate datele pe care le consideră utile în vederea precizării unui diagnostic și a instituirii celor mai adecvate măsuri de tratament și profilaxie. Numai îmbinarea competentă a tuturor factorilor care stau la baza apariției unei stări de boală poate să elimine greșelile de diagnostic și, ca urmare, erorile în aplicarea măsurilor corespunzătoare. Tentația de a privi adesea problemele, unilateral, dintr-un singur punct de vedere, se poate solda cu serioase greșeli de interpretare, care nu rareori au ca urmare grave implicații economice. Trebuie avută în vedere și posibilitatea coexistenței mai multor cauze, care se suprapun și care complică situația dată. Izolarea unui germen nu înseamnă neapărat că el este agentul cauzal. Este necesar ca eventualitatea de a-l desemna ca factor etiologic să fie pusă față în față cu alte posibilități, relevate de datele pe care le furnizează anamneza, dinamica îmbolnăvirilor și a mortalității, tabloul clinic și anatomopatologic, precum și alte mijloace de investigație.

Medicul veterinar practician, chiar dacă nu are posibilitatea de a aplica anumite metode de diagnostic mai pretențioase, trebuie să știe să ceară efectuarea lor la nivelul laboratoarelor județene. De asemenea

este necesar să știe să interpreteze datele pe care acestea le oferă prin buletinele de analiză sau prin indicațiile date.

Nu este lipsit de interes să se sublinieze că și la nivelul dotației modeste pe care o presupun unitățile de teren, medicul practician poate să efectueze anumite examene de laborator mai puțin pretențioase, fapt care îi conferă, pe de o parte, siguranță și erudiție profesională, iar pe de altă parte prestigiul în fața factorilor tehnici cu care conlucrează. Existența în dotarea unei bune părți din aceste unități a microscoapelor și a altor ustensile de strictă necesitate, permite efectuarea unui minim de examene, care adesea contează hotărîtor în aplicarea promptă a măsurilor necesare. Astfel, de exemplu, practicarea unor frotiuri din sîngele animalelor vii cu forme septicemice de antrax sau din organele animalelor sacrificate de necesitate și suspecte, permite o decizie promptă în aplicarea măsurilor referitoare la restul efectivului. Asemenea acțiuni ar evita, fără îndoială, și accidentele grave cauzate, de exemplu, de darea în consum a cărnii provenită de la asemenea animale și care este atît de periculoasă, dată fiind receptivitatea omului, mai ales în cazul existenței unor leziuni.

Efectuarea unor examene ovohelmintoscopice sau a unor simple preparate între lamă și lamelă permite un diagnostic prompt într-o serie de boli parazitare de largă răspîndire. Este suficient să se amintească în acest sens ascaridoza, strongiloza, coccidioza, fascioloza, moniezioza, dictiocauloza, scabia, a căror existență poate fi confirmată pe loc, cu aceeași precizie cu care o face un laborator veterinar. Este necesară însă preocuparea în acest sens, strădania de autodotare, chiar dacă aceasta are izul unor improvizații. Esențial este ca ele să-și atingă scopul și să se obțină rezultate.

Ar fi bine, poate, de amintit că, în calitatea sa, medicul veterinar este chemat să întreprindă și lucrări de cercetare. Acestea pe lîngă că satisfac valențe de ordin practic pe linie profesională, conferă celui ce le întreprinde un plus de probitate științifică, îi permit să argumenteze competent că ceea ce susține derivă din observații și expertize personale. Acest lucru permite de asemenea un contact permanent cu noutatea, cu progresele științei veterinare și, implicit, cu aplicarea mijloacelor celor mai adecvate pentru etapa actuală. Așa cum în întreprinderi funcționează laboratoarele uzinale, iar în agricultură cîmpurile experimentale, trebuie să fie posibil și ca medicul veterinar să efectueze o muncă de cercetare chiar la nivelul unităților de producție. Zootehnia modernă, prin condițiile de cercetare și de exploatare în mari efective, favorizează culegerea de informații pe un număr mare de indivizi, ceea ce face ca constatările să aibă o bază cazuistică bogată. Trebuie numai ca datele să fie interpretate și puse în slujba practicii curente.

Protecția muncii în lucrările de laborator

Prin specificul activității sale, medicul veterinar este permanent în situația de a lucra într-un mediu care presupune pericole. În munca de laborator aceste pericole constau în special în aceea că o serie dintre agenții bacterieni, virali și chiar parazitari întîlniți la animale, au caractere de patogenitate și pentru om. Așa-numitele antropozoonoze pot să fie transmise acestuia fie prin contactul direct cu animalele bolnave sau purtătoare și eliminatoare de germeni, fie prin manipularea produselor patologice de la acestea sau a materialelor contaminate. Antraxul, morva, leptospiroza, febra Q, turbarea, salmoneloza, psitacoza, tuberculoza, tetanosul, botulismul, tularemia, trichineloza, tricofiția, toxoplasmoza, sînt numai cîteva exemple din cele peste 100 de entități morbide care, pe tot globul, sînt comune omului și animalelor. Pericolul pe care îl reprezintă trebuie considerat cu atît mai important, cu cît multe din aceste infecții pot genera accidente mortale, prin gravitatea cu care evoluează. Este semnificativ în acest sens să se sublinieze că boli ca turbarea, botulismul etc., sînt necruțătoare.

Laboratoarele și încăperile anexe vor fi ținute în permanență într-o ordine perfectă. După terminarea lucrărilor, de fiecare dată, materialele (instrumentar, ustensile etc.) cu care s-a lucrat se adună și se trimit la sterilizare în cazul că s-a lucrat cu produse contaminate, sau se spală în celelalte cazuri. Ele se pun apoi în dulapuri speciale pe categorii, pentru ca la nevoie să se știe de unde pot fi luate. Este bine ca în asemenea laboratoare să existe dulapuri separate pentru diferitele categorii de ustensile: sticlărie sterilizată, coloranți, instrumente, reactivi și magazii corespunzătoare pentru medii de cultură neinoculate, pentru culturi care se păstrează la temperatura camerei, camere frigorifice pentru cele care se conservă la temperaturi joase, sau refrigeratoare pentru produse biologice, care se congelează. Toate acestea trebuie să poarte etichete detaliate cu privire la conținutul recipientelor.

Mesele de lucru se lasă după fiecare lucrare în stare de curățenie perfectă și se dezinfectează, pentru ca, la începerea unor lucrări noi, să existe condiții corespunzătoare de lucru.

Ca urmare, respectarea unor principii de protecție a muncii este o necesitate cît se poate de stringentă, mai ales în condițiile activităților de laborator, care presupun un contact permanent ca surse generatoare de asemenea accidente. Iată cîteva dintre acestea:

— În laboratoare, una dintre condițiile sine qua non o reprezintă

îmbrăcămintea și materialele de protecție. Utilizarea halatelor de protecție este menită să evite contaminarea sau deteriorarea prin diferiți reactivi chimici a îmbrăcămintei proprii și, în același timp, permite aplicarea corespunzătoare a operațiunilor de sterilizare.

— Folosirea măștilor de tifon individuale se impune ori de cîte ori se lucrează cu materiale conținînd germeni transmisibili pe cale aerogenă.

— Utilizarea mănușilor de cauciuc, mai ales cînd se lucrează cu materiale patologice suspecte de a conține germeni patogeni (în caz de turbare, antrax, leptospiroză etc.), permite o manipulare fără riscuri a acestora și evită deci accidentele.

— Manipularea instrumentelor, a aparatelor și materialelor contaminate sau suspecte de contaminare se va face cu deosebită atenție, evitîndu-se atingerea părților care au venit în contact cu materialele suspecte. Ele se vor reutiliza numai după prealabila sterilizare prin fierbere, autoclavare sau prin acțiunea agenților chimici.

— În cazul în care se întîmplă să se atingă totuși asemenea materiale contaminate sau suspecte, se va recurge imediat la spălarea minuțioasă cu apă caldă și săpun a regiunilor atinse după care se vor dezinfecta cu soluții dezinfectante (cloramină 2%, formol 1%, sodă caustică 0,5%). Aceeași conduită se adoptă și cînd se vine în contact cu medii de cultură în care s-au cultivat germeni sau cu suspensii bacteriene necesare diferitelor operațiuni de diagnostic bacteriologic etc.

— Dacă masa de lucru a fost contaminată cu produse care conțin germeni (culturi microbiene, suspensii virale, organe suspecte) se va acoperi zona respectivă cu vată sau tifon îmbibate cu substanțe antiseptice și numai după ce a trecut un timp necesar distrugerii acestora, se trece la curățirea propriu-zisă a locului respectiv. Cînd asemenea materiale ajung pe halatul de protecție acesta va fi dat imediat la sterilizare (fierbere sau autoclavare) și numai după aceea va fi reutilizat.

— Dacă pe masă au ajuns substanțe chimice periculoase, ele vor fi în prealabil neutralizate și numai apoi se îndepărtează (dacă sînt substanțe alcaline se vor neutraliza cu acizi și invers).

— Nu vor fi lăsate niciodată materiale sau vase conținînd eventuali agenți patogeni, descoperite sau în poziții care să expună la contaminări.

— Este interzisă utilizarea de pipete în operațiuni cu materiale conținînd germeni sau soluții chimice periculoase, fără ca ele să aibă la partea superioară un dop de vată de protecție. Este preferabil în aceste cazuri să se pipeteze cu pere de cauciuc, evitîndu-se aspirarea cu gura. Se pot folosi în asemenea cazuri, ca și atunci cînd se lucrează cu soluții caustice sau toxice, pipetele cu bulă de siguranță.

— Cînd se lucrează cu substanțe toxice care degajă vapori nocivi, este necesar să se recurgă la nișe speciale cu hote de evacuare sau în boxe care să evite orice accidente.

— Este interzis fumatul, mîncatul și băutul în încăperile în care se lucrează cu germeni sau cu substanțe toxice.

— Manipularea animalelor de experiență necesare inoculărilor experimentale se va face cu deosebită atenție, după o prealabilă contenție corespunzătoare, care să le facă inofensive pe tot cursul operației.

Dacă, cu toate măsurile de protecţie luate se întîmplă totuşi anumite accidente se vor avea în vedere următoarele:

— Orice lichide (suspensii bacteriene sau virale, stropi din materialul patologic suspect) care ajung la nivelul cavităţii bucale nu vor fi deglutite, ci imediat scuipate. Imediat se procedează la spălări şi gargarisme repetate cu soluţii de permanganat de potasiu 1‰ sau apă oxigenată 1‰. Apoi se clăteşte gura cu apă, fără a se degluti; operaţiunea se repetă de mai multe ori, timp de o oră.

— În situaţia cînd, în mod reflex, materialul infecţios a fost deglutit, se vor face spălături repetate şi gargare cu aceleaşi soluţii pe lîngă care se vor degluti soluţii slabe (n/10) de acid clorhidric şi se va încerca provocarea reflexă a vomizării. Operaţiunea se repetă de mai multe ori.

— Dacă lichide septice sau suspecte ajung pe conjunctivă, în primul rînd se va evita pe cît posibil să se clipească, pentru a evita difuzarea în sacul conjunctival. Se recurge imediat la spălarea cu apă şi apoi cu o soluţie slabă de oxicianat 0,001‰. Deoarece lichidele acestea pot ajunge prin canalul lacrimo-nazal în cavitatea nazală şi bucală se vor face concomitent şi operaţiunile enunţate la dezinfecţia gurii. Nasul se va sufla energic evitîndu-se inspiraţia pe nas. Se va instila apoi soluţie de oxicianat 0,001‰.

— În cazul că în cursul operaţiunilor de inoculare la animalele de experienţă se produc muşcături sau zgîrieturi, se va recurge la spălarea imediată a rănii, lăsarea să sîngereze din abundenţă şi apoi badijonarea cu tinctură de iod şi pansarea.

— Dacă este vorba de material conţinînd germeni foarte periculoşi (antrax, turbare, tetanos), pe lîngă măsurile acestea de urgenţă se va solicita imediat intervenţia medicului, pentru instituirea măsurilor de prevenire a infecţiei.

Fiecare laborator sau grup de laboratoare, avînd un anumit specific de lucru, trebuie să dispună de un dulăpior sanitar în care să existe un minimum de ustensile şi produse farmaceutice de prim ajutor (vată, tifon, alcool, tinctură de iod, soluţie de 1‰ permanganat de potasiu, soluţie 1‰ apă oxigenată, soluţie 0,001‰ oxicianat, unguente cu antibiotice cum sînt penicilina, cloramfenicolul, aureomicina). Ele trebuie să fie amplasate în locuri uşor accesibile.

Sterilizarea şi dezinfecţia

În laboratoarele în care se lucrează cu agenţi patogeni, sterilizarea şi dezinfecţia reprezintă operaţiuni deosebit de importante, în primul rînd pentru preîntîmpinarea contaminării personalului, dar şi pentru a împiedica difuziunea în mediu a acestor agenţi.

Sterilizarea este un termen larg care presupune distrugerea microorganismelor, indiferent de mijlocul folosit, în timp ce prin dezinfecţie se înţelege în special distrugerea germenilor cu ajutorul unor substanţe chimice.

Sterilizarea se poate realiza prin agenţi fizici şi chimici.

Sterilizarea prin agenţi fizici

a) Sterilizarea prin căldură poate fi uscată (flambare, încălzire la roşu, aer cald) şi umedă (fierbere, autoclavare, tindalizare, pasteurizare);
b) Sterilizarea prin radiaţii: ultraviolete, gamma;
c) Sterilizarea prin filtrare.

a) Sterilizarea prin căldură

Sterilizarea prin căldură uscată poate fi de mai multe feluri.

— *Sterilizarea prin flambare* este cea mai simplă şi constă în trecerea obiectului sau a suprafeţei de sterilizat prin flacără timp de cîteva secunde, de mai multe ori la interval de 3—4 secunde. Metoda se foloseşte în cazul pipetelor Pasteur (extremitatea efilată), pentru sterilizarea gurii eprubetelor şi flacoanelor sau altor recipiente cînd se lucrează steril. Nu se pot steriliza prin flambare obiectele din materiale inflamabile.

Sterilizarea prin încălzire la roşu este folosită în cazul anselor de însămînţare şi a spatulelor.

Sterilizarea prin aer cald se realizează în diferite cuptoare în care aerul este încălzit între anumite limite convenabile scopului urmărit (etuve, sterilizatoare Poupinel, cuptoare Pasteur). Majoritatea lor funcţionează pe bază de rezistenţe electrice şi sînt prevăzute cu termoregulatoare.

Obiectele care urmează a fi sterilizate trebuie să fie uscate şi se învelesc în hîrtie albă, care joacă şi rolul de indicator al sterilizării, în

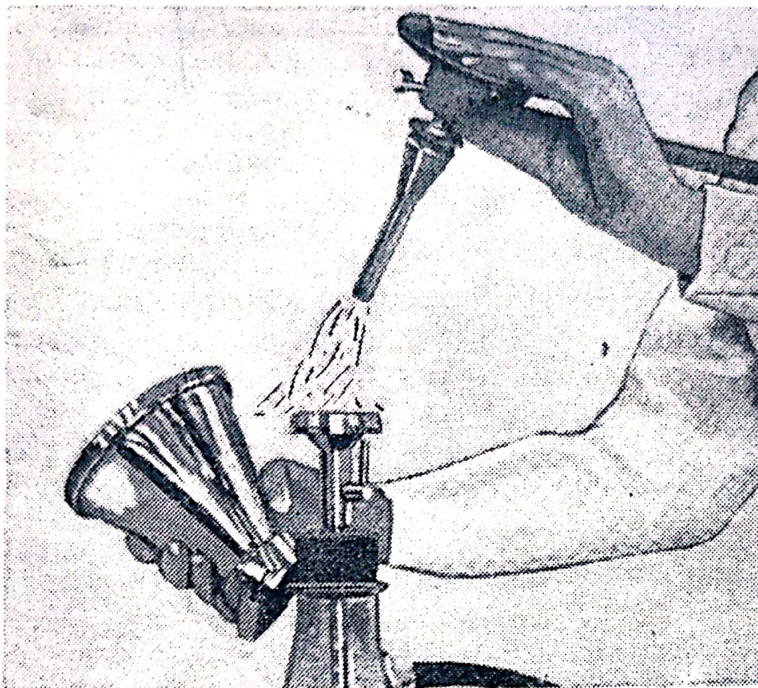


Fig. 1 — **Sterilizarea prin flambare**

sensul că aceasta este corectă cînd hîrtia, sub acţiunea căldurii, devine cafenie. Ea trebuie însă să rămînă intactă. Timpul de sterilizare diferă cu temperatura:

— la 160°C — sînt necesare 2 ore;
— la 170°C — este necesară o oră;
— la 180°C — este necesară 1/2 oră.

Se înţelege că se sterilizează în acest mod materialele şi obiectele care nu se deteriorează la aceste temperaturi (sticlăria şi în nici un caz materialul plastic, obiectele de cauciuc, sticlăria cu armături metalice). Sticlăria de laborator cum ar fi pipetele gradate, plăcile Petri, mojarele, ţeava fuzibilă, baloanele etc., se pot steriliza în condiţii foarte bune cu aer cald, dar şi prin autoclavare.

Sterilizarea prin căldură umedă poate fi şi ea de mai multe feluri.

Sterilizarea prin fierbere se foloseşte mai ales pentru instrumentele metalice, pentru siringi, dopuri, garnituri, racorduri sau alte obiecte de cauciuc. Pentru a le proteja de acţiunea nocivă a unor săruri conţinute de apa de robinet, este indicată fierberea în apă distilată, la care se adaugă borax sau carbonat de sodiu, pentru a împiedica ruginirea. Durata fierberii este de cel puţin 30 de minute din momentul clocotirii apei. Temperatura de 100°C, timp de o jumătate de oră, distruge toate formele vegetative şi chiar unele forme microbiene sporulate. Trebuie specificat că există spori bacterieni care rezistă la 100°C, fapt care face ca metoda să nu fie suficientă, mai ales dacă se impun condiţii riguroase de sterilizare. În plus, obiectele sterilizate în acest fel nu pot fi întrebuinţate ca sterile decît imediat după fierbere.

Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclavarea) se realizează în aparate speciale denumite autoclave. Ele sînt nişte cazane care se pot închide ermetic şi în care, printr-o sursă calorică (gaz sau cu-

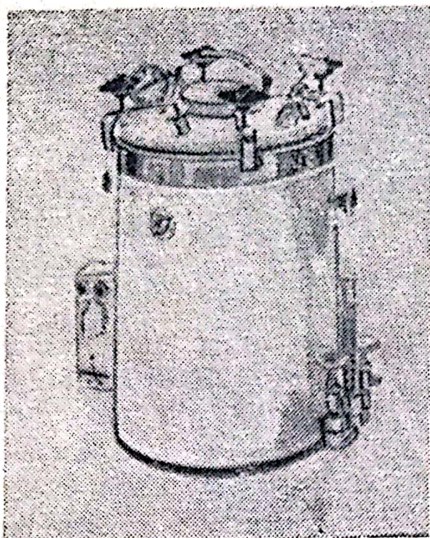


Fig. 2 — Autoclav electric

rent electric), se poate realiza o atmosferă de vapori încălziţi la 100—135°C şi sub presiunea de 1—2 atmosfere. Fiecare autoclav trebuie să fie prevăzut cu un manometru care indică presiunea interioară şi indirect temperatura (cunoscînd că unei atmosfere îi corespunde temperatura de 120°C). Este important de subliniat că prin intermediul unui robinet special, înainte de sterilizarea propriu-zisă trebuie eliminat aerul din interior, presiunea realizîndu-se pe seama vaporilor de apă existenţi în cazan. Pentru evitarea eventualelor accidente cauzate de suprapresiuni datorite nesupravegherii, autoclavele sînt prevăzute şi cu supape de siguranţă. Durata necesară sterilizării este variabilă cu presiunea realizată:

— la 0,5 atmosfere (112°C) — 90 de minute;
— la 1,0 atmosferă (120°C) — 30 minute;
— la 2,0 atmosfere (134°C) — 10 minute.

Prin autoclavare se sterilizează majoritatea mediilor de cultură, sticlăria, aparatele de sticlă cu garnituri de cauciuc, materiale de protecţie, soluţiile şi toate materialele infecte. Acestea se aşază în cutii de tablă cu pereţi găuriţi, în coşuri din plasă de sîrmă (flacoanele cu medii sau soluţii, eprubetele) sau în casolete (vată, materiale de protecţie). Recipientele conţinînd lichid, pe lîngă dopul de vată, trebuie să fie legate la gură şi cu hîrtie. Recipientele al căror dop a fost aruncat în cursul sterilizării, nu se consideră sterilizate.

Presiunea şi implicit temperatura din interiorul autoclavului sînt controlabile cu ajutorul manometrului, dar se poate recurge la nevoie şi la determinări cu ajutorul unor substanţe care la temperatura camerei sînt solide dar peste anumite limite, cunoscute, se lichefiază. În acest scop, ele se introduc în tuburi capilare, închise la flacără, care se pun în autoclav odată cu materialele de sterilizat şi se verifică dacă, la deschiderea capacului, ele sînt sau nu în stare lichidă, aceasta indicînd atingerea temperaturii dorite. Dintre substanţele cele mai folosite pot fi amintite următoarele, împreună cu punctul corespunzător de topire: acidul oxalic 101°C, benzonaftolul 110°C, chinina 116°C, sulful (floarea de sulf) 120°C, acidul benzoic 121°C, ureea 132°C.

În vederea sterilizării materialele trebuie pregătite corespunzător:

— pipetele gradate se astupă la extremitatea prin care se aspiră, cu un dop de vată, după care se învelesc în hîrtie sau staniol;

— plăcile Petri şi mojarele se împachetează în hîrtie de ambalaj;

— bucăţile de ţeavă din care se confecţionează pipetele Pasteur se astupă la ambele capete cu dopuri de vată şi se ambalează în hîrtie, cîte 20—30 într-un pachet;

— baloanele se astupă cu dopuri de vată, se înveleşte gîtul cu hîrtie şi apoi se leagă cu sfoară;

— la aparatele de filtrare se împachetează în hîrtie filtrul şi tubulura laterală a balonului;

— eprubetele se astupă cu dopuri de vată și tifon, se învelesc în hîrtie și se pun în coșuri de sîrmă;

— instrumentele metalice învelite în tifon, se pun în plăci de sticlă care, la rîndul lor, se învelesc în hîrtie; se poate face, și este preferabil, sterilizarea în cutii speciale nichelate, prevăzute cu orificii care, la scoaterea din autoclav, se vor închide;

— materialele moi (vată, tifon, pînză) se sterilizează în casolete, ale căror orificii se închid la scoaterea din autoclav.

Sterilizarea prin tindalizare (încălzire fracționată) se folosește cînd substanțele de sterilizat au un grad de termolabilitate, care le face ca la 120°C să se denatureze (medii de cultură conținînd zaharuri sau substanțe proteice macromoleculare cum ar fi oul, serul coagulat etc.). Sterilizarea se face la temperatura suportată de materialele respective, de mai multe ori (2—3 ori) consecutiv, timp de o oră, la interval de 24 de ore. Așa de exemplu, tindalizarea mediilor conținînd zaharuri se face la 100°C, a serului coagulat sau a mediilor cu ou, la 70—80°C. Ea se realizează în autoclavul cu capacul nestrîns sau deschis, sau în dispozitive speciale care realizează condițiile dorite și permit în același timp controlul lor.

Prin acest procedeu, la prima încălzire se distrug formele vegetative ale bacteriilor. Formele sporulate se transformă în vegetative prin termostatare la 37°C care, prin cea de a doua încălzire se vor distruge. Cea de a treia încălzire va asigura sterilizarea completă, prin distrugerea ultimelor forme vegetative rezultate din germinarea sporilor rămași după a doua încălzire.

Sterilizarea prin pasteurizare se folosește pentru lichide, ea realizînd numai distrugerea formelor vegetative, nu și a sporilor. Ea se poate face la 60—65°C timp de 30 minute (pasteurizarea joasă), la 70—75°C timp de 10—20 minute (pasteurizare medie) sau la 85—90°C timp de cîteva secunde, urmată de o răcire bruscă (pasteurizare înaltă). În mod curent, această metodă se folosește în industria laptelui și are ca scop distrugerea germenilor patogeni, fără a altera valoarea alimentară și vitaminele conținute.

b) Sterilizarea prin radiații

Poate folosi razele ultraviolete și radiațiile gamma.

Sterilizarea prin raze ultraviolete se folosește pentru suprafețe plane și încăperi (mai ales boxe sterile). În acest scop servesc lămpile speciale de diferite intensități, ce dau radiații cu o lungime de undă între 2400 și 2800 Å. Numărul acestor lămpi depinde de mărimea suprafeței sau volumul încăperii de sterilizat. Durata iradierii este variabilă, în general de cîteva ore pînă la 24 de ore. Acțiunea lor bactericidă se limitează la formele vegetative.

Sterilizarea prin radiații gamma se folosește în special pentru vasele de material plastic (plăci Petri).

c) Sterilizarea prin filtrare

Sterilizarea prin filtrare se folosește în special pentru gaze sau lichide care trebuie aduse în postura de a fi libere de germeni (bacterieni și micotici). În cazul lichidelor, metoda se folosește mai ales cînd e vorba de soluții care conțin substanțe alterabile prin căldură (toxine, lichide biologice, medii de cultură). Virusurile trec prin porii acestor filtre, așa încît metoda nu poate fi folosită pentru a debarasa aceste lichide de

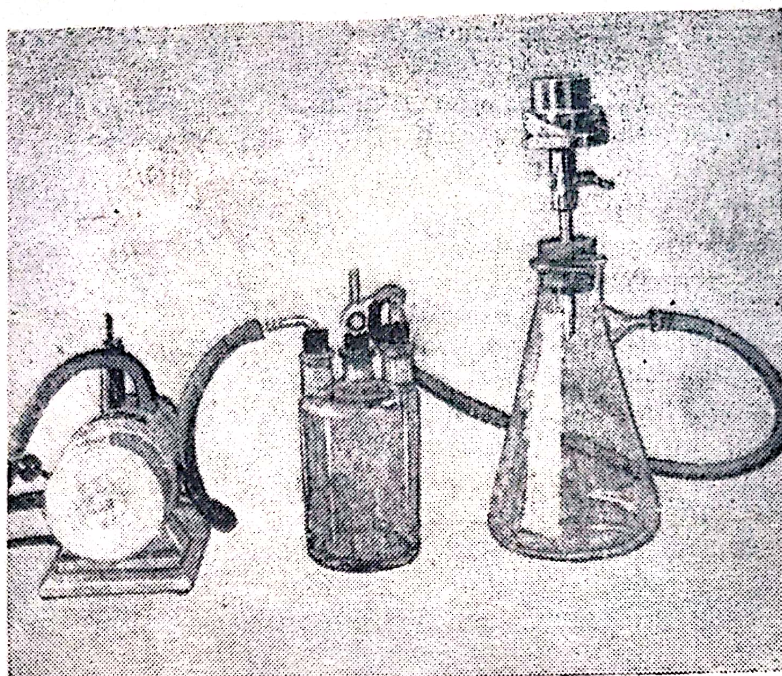


Fig. 3 — Sistem de filtrare cu vid

asemenea agenți (există totuși filtre care rețin unele virusuri, fapt dependent de porozitatea filtrului și de diametrul virusurilor).

Filtrele ce se folosesc în aceste scopuri pot fi de mai multe tipuri:

— Chamberland sînt confecționate din porțelan ars, au forma unor lumînări (bujii) și sînt notate cu L_1, $L_2 \ldots L_7$, porii cei mai mici fiind în cazul filtrului notat cu L_7;

— Berkefeld fabricate din pămînt de infuzorii sau kiselgur au ceeași formă ca și precedentele și au trei grade de porozitate (W = porii cei mai mici, N = pori intermediari, V = pori mari);

— filtre Seitz sînt preparate din amestec de celuloză și azbest, sub formă de plăci filtrante care se montează în dispozitive speciale metalice, care se adaptează la baloane de tip Kitassato, racordabile la vid, deci prin presiune negativă; există și sisteme în care filtrarea se realizează prin presiune în partea superioară a filtrului, deci traversarea plăcilor filtrante se face nu prin aspirație, ci prin presiune; aceste filtre sînt notate în funcție de porozitate cu EKS, EKS_1, EKS_2 și EKS_3 (fil-

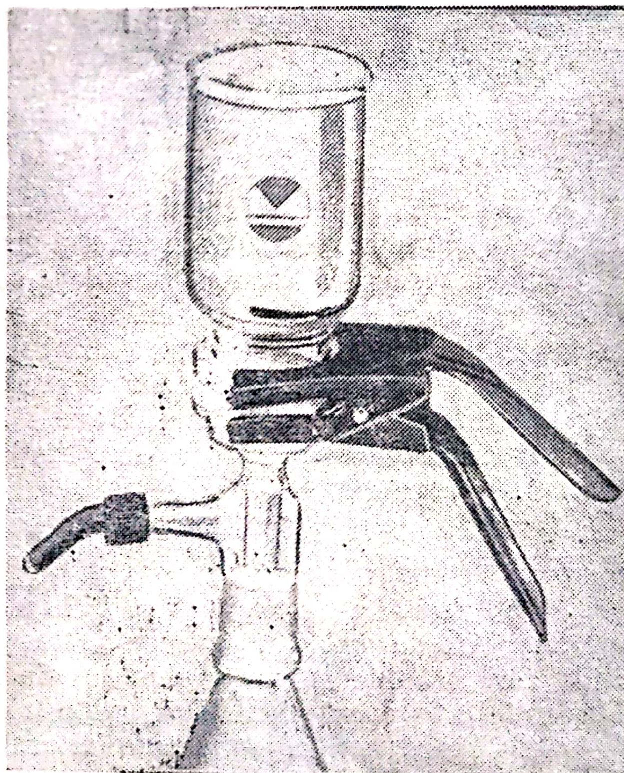


Fig. 4 — Filtru de sticlă cu clemă

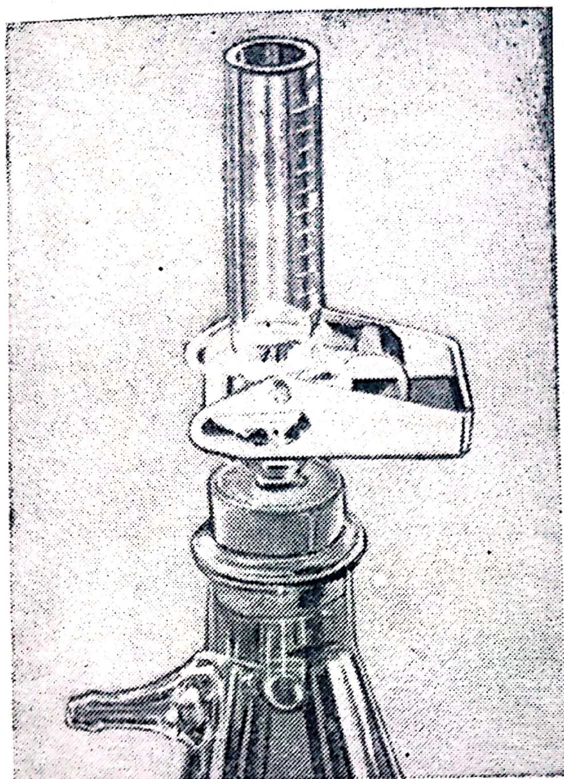


Fig. 5 — **Filtru de sticlă adaptat prin dop de cauciuc**

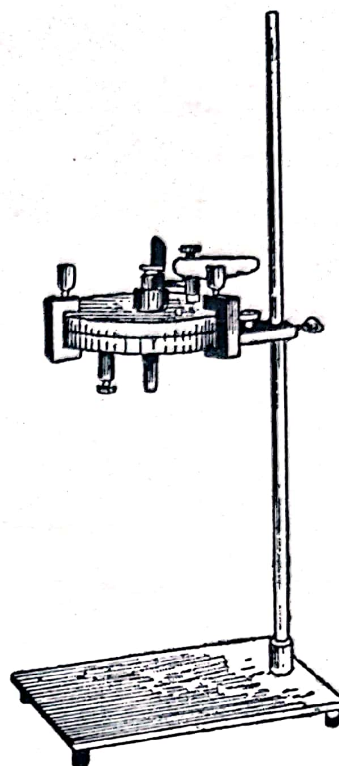


Fig. 6 — **Placă filtrantă cu carcasă metalică**

trele EKS_1 rețin bacteriile fiind permeabile pentru virusuri, iar EKS_2 rețin și virusurile de dimensiuni mari); se folosesc la separarea unor toxine bacteriene, sterilizarea unor seruri sau lichide contaminate cu bacterii; membranele odată folosite nu mai pot fi refolosite;

— filtrele de sticlă se prezintă sub formă de plăci filtrante montate în pîlnii, de diferite forme și care se adaptează la baloane cu tubulură laterală sau dispun de dispozitive proprii de etanșeizare; cele mai frecvent folosite sînt filtrele tip Schott, notate cu G_1 pînă la G_5, acestea din urmă avînd porozitatea cea mai fină; aceste filtre au avantajul că nu influențează pH-ul lichidelor filtrate și se pot folosi vreme îndelungată, dacă sînt îngrijite corespunzător după fiecare folosire; sterilizarea lor se face numai la autoclav;

— membranele filtrante se pot confecționa din diferite materiale (colodiu, celuloză sau material plastic) și se folosesc în special în virusologie, cînd sînt necesari pori de dimensiuni foarte mici (5—3000 milimicroni).

Deosebit de răspîndite au devenit în ultimul timp membranele filtrante celulozice de tip „Millipore“ (Millipore Intertech Corp. U.S.A.). Ele au pori de diferite dimensiuni, sînt foarte ușor de manevrat și servesc în scopuri foarte variate: debarasarea unor lichide de germeni, determinări cantitative de germeni din lapte, produse lactate, ape potabile sau reziduale. După scopul în care se folosesc ele se pot adapta la siringi, la vase racordate la pompe de vid sau la pompe de presiune și au capacități variabile.

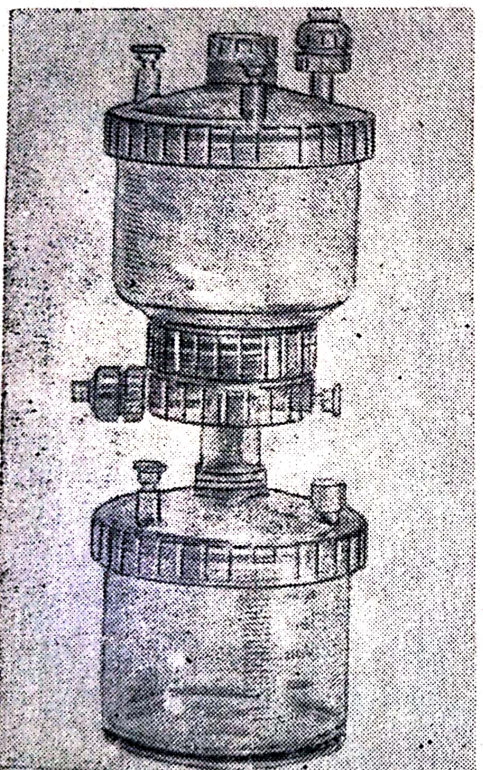


Fig. 7 — Sistem de filtrare din material plastic

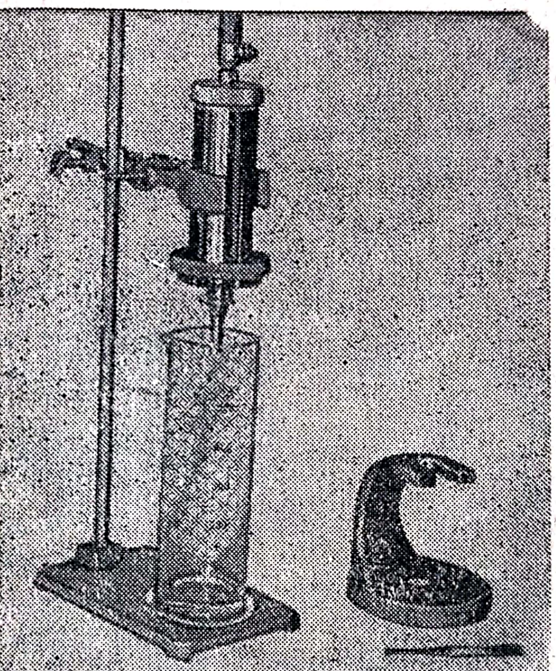


Fig. 8 — Dispozitiv de filtrare, cu presiune

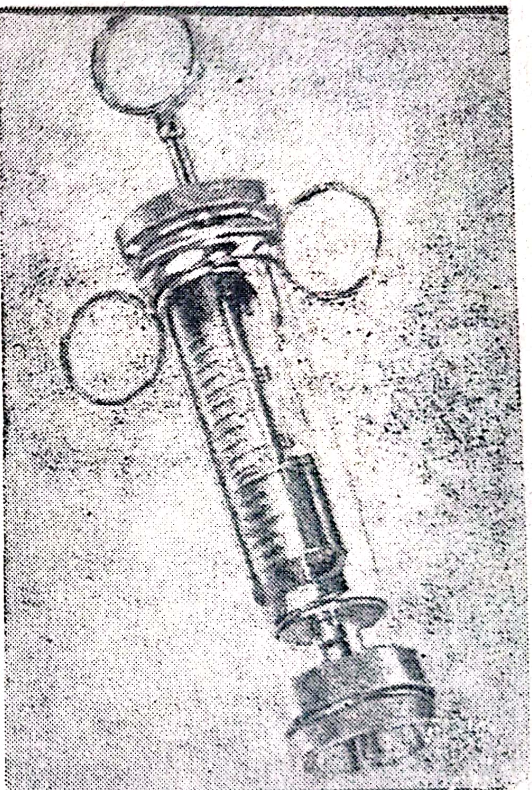


Fig. 9 — Dispozitiv de filtrare adaptabil la seringă

Tabelul 1

Principalele substanțe chimice cu acțiune dezinfectantă

Nr. crt.	Denumirea substanței	Scopul în care este folosită
1	Acid acetic 1%	Dezinfecția pipetelor și lamelor în laboratoarele care se ocupă cu studiul germenilor din genul Leptospira
2	Alcool etilic 70°	Dezinfecția curentă a mîinilor
3	Alcool medicinal	
4	Apa oxigenată 1%	Dezinfecția mucoaselor
5	Bicromat de potasiu 5%	Dezinfecția pipetelor întrebuințate
6	Cloramina	a) Dezinfecția mîinilor (sol. 1%) b) Dezinfecția meselor de laborator, cuștilor de animale (conc. 5%)
7	Clorură mercurică (sublimat corosiv)	a) Dezinfecția meselor și altor categorii de mobilier din sticlă, faianță, tăvi de material plastic etc. (conc. 0,1%) b) Dezinfecții mai riguroase ale mîinilor
8	Creolina 5–10%	Dezinfecția adăposturilor — în cazul bolilor provocate de agenți nesporulați (dezinfectant slab)
9	Clorura de var (2–5% clor activ)	Dezinfecția curentă a grajdurilor
10	Detergenți diferiți	a) Dezinfecția mîinilor (sol. 0,1%) b) Spălarea sticlăriei
11	Formol — sol. 40%	a) Dezinfecția obiectelor din sticlă, faianță, tăvi de metal din laborator (în conc. de 5%) b) Dezinfecția grajdurilor, curților, obiectelor, în diferite infecții bacteriene și virale (sol. 5%) c) Inactivarea culturilor microbiene în vederea preparării unor vaccinuri (conc. 0,1–2%)
12	Hidroxid de sodiu (soda caustică)	a) Dezinfecția mobilierului, dușumelelor cuștilor de animale (conc. 0,5–3%) b) Dezinfecția adăposturilor de animale și a curților în caz de epizootii (conc. 2–3%)
13	Fenol (acid fenic)	a) Dezinfecția diferitelor obiecte din sticlă, porțelan, metal etc. (sol. 5%) b) Conservarea serurilor imune (conc. 0,5%)
14	Permanganat de potasiu 0,1%	Dezinfecția mucoaselor
15	Oxicianat de sodiu sol. 0,01–0,001%	Dezinfecția mucoaselor
16	Tinctura de iod	Dezinfecția locurilor de puncție

Sterilizarea prin agenţi chimici

Foloseşte diferite substanţe, care, prin însuşirile lor fizico-chimice, au un efect nociv asupra microorganismelor, ducînd la distrugerea lor după perioade variabile de contact.

Unele substanţe antimicrobiene sînt utilizate pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor într-un mediu de cultură sau lichid biologic, sau pentru distrugerea completă a lor (în primul caz e vorba de acţiune bacteriostatică şi se obţine prin doze reduse, iar în cel de al doilea — acţiune bactericidă şi se obţine prin doze mari).

Substanţele chimice antimicrobiene au capacitatea de a fi selective în sensul că pot exercita o acţiune bactericidă pentru unii germeni, bacteriostatică sau indiferentă pentru alţii.

În compoziţia unor medii de cultură selective sînt înglobate substanţe ca verde de malahit, verde briliant, cristal violet, roşu de Congo, care inhibă creşterea unor specii bacteriene, favorizînd dezvoltarea altora.

Pentru distrugerea germenilor în mediul înconjurător, substanţele chimice cele mai frecvent folosite sînt cele prezentate în tabelul 1.

Tehnica recoltării, ambalării şi transportului materialelor patologice pentru examene de laborator

Materialele patologice care servesc pentru diagnosticul de laborator al diferitelor stări de boală la animale sînt foarte diferite în funcţie de natura bolii, de faza evolutivă în care se află, în funcţie de starea animalului de la care provin şi de posibilităţile materiale de examinare. Medicul veterinar, atît cel de laborator, cît şi practicianul, trebuie să cunoască temeinic ce fel de materiale patologice se pretează pentru diagnosticul fiecărei entităţi morbide, alegînd întotdeauna pe acelea care oferă în cea mai mare măsură şansa de a stabili un diagnostic real, precis şi cît mai precoce. Pentru medicul de laborator sînt imperios necesare aceste cunoştinţe, pentru a fi capabil să se adreseze în cursul examenelor ce le efectuează, materialelor care sînt cele mai indicate şi care-i permit să ajungă la o concluzie într-un timp cît mai scurt. Pentru medicul practician este necesar să cunoască aceste probleme pentru a trimite spre examinare materialele cele mai adecvate şi în condiţii adecvate, care să permită efectuarea probelor de laborator în vederea precizării diagnosticului.

În funcţie de examenele care se efectuează se trimit la laborator materialele arătate în continuare.

1. **Pentru examenul bacterioscopic şi bacteriologic.**

Sîngele se pretează pentru aceste examene sub formă de frotiuri sau ca atare. Frotiurile se vor efectua întocmai ca în cazul examenului hematologic, pe lame obişnuite de microscop. După uscare, dacă e nevoie să fie transportate, se va avea grija ca suprafeţele lamelor să nu vină în contact între ele (se pun în cutii separate, sau se izolează una de alta cu ajutorul unor beţe de chibrit sau cu hîrtie).

Pentru hemocultură, se recoltează prin puncţie venoasă, după prealabila asepsie, 5—10 ml sînge, în funcţie de specie şi talia animalului, în eprubete sau sticluţe sterile. Dacă sînt mai multe probe, ele se vor individualiza prin numerotare. Transportul pentru lucrările de însămînţare se va face cît mai urgent.

Lichidul cefalorahidian se va recolta cu ace de seringă sterile în eprubete de asemenea sterile, pe un anticoagulant (de exemplu heparină).

Urina se recoltează în recipiente sterile. De la femelă este preferabilă recoltarea prin cateterism, în acest fel evitîndu-se ca germenii de pe căile urinare să falsifice rezultatele examenului. Urocultura este de

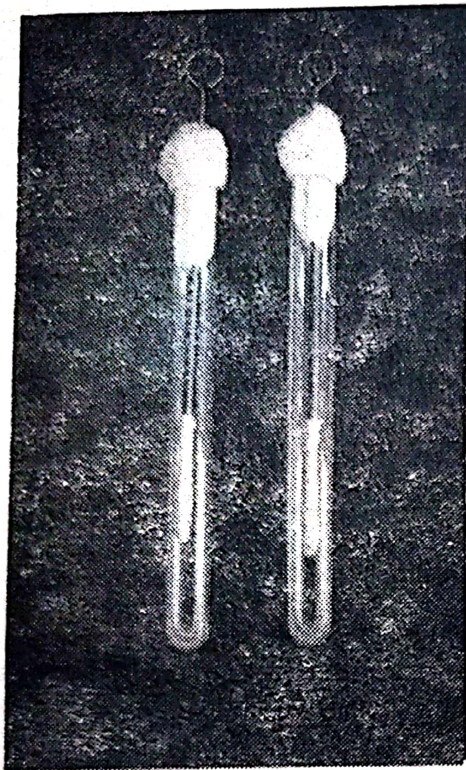


Fig. 10 — Tampoane sterile pentru recoltarea de secreții patologice

dorit să se practice și ea cît mai precoce după recoltare.

Secrețiile (oculare, nazale, vaginale etc.) se vor recolta cu tampoane sterile pregătite în prealabil, special în acest scop. Ele sînt fixate pe baghete de sticlă sau metal, care, la rîndul lor, sînt introduse în eprubete de mărime corespunzătoare și sterilizate prin autoclavare.

Lichidele patologice de puncție se vor recolta întocmai ca sîngele, în eprubete sau recipiente sterilizate.

Organele se vor trimite de preferință întregi sau fără a fi scoase din cadavrul respectiv, pentru ca operațiunile de însămînțare să se poată face în condiții cît mai bune. Se înțelege că și în acest caz transportul trebuie să se facă în condiții cît mai bune și rapid, pentru ca însămînțările să fie făcute înainte de invadarea cadavrului de germenii saprofiți intestinali. Cel mai bun lucru este să se trimită (în cazul animalelor mici și mijlocii) animalele în stare preagonică, fapt care permite recoltarea tuturor probelor necesare, în condiții optime. Dacă nu este posibil acest lucru, se vor recolta, cu instrumente sterilizate prin flambare, porțiuni de organe care se vor trimite în recipiente sterilizate, pentru însămînțări.

Laptele se va recolta în eprubete sterile, avîndu-se grijă să se înlăture primele picături de pe canalul galactofor, acestea conținînd germeni ajunși aici din mediul extern, prin orificiul papilar.

2. **Pentru examenele virusologice** se pot recolta materiale patologice diferite, în funcție de entitatea morbidă în cauză: sînge (numai în faza de viremie), secreții (mai ales în bolile respiratorii, cum sînt rinotraheita bovinelor, parainfluența bovinelor, adenoviroze etc.), fecale (infecții cu enterovirusuri, adenovirusuri, virusul diareei virotice a bovinelor, virusul gastroenteritei infecțioase a porcinelor etc.), organe (turbare, boala lui Aujeszky, hepatita virotică a cîinilor, leucoza aviară etc.), lichidele veziculare (febra aftoasă, exantemul veziculos al porcului), epitelii mucoase sau cutanate (febra aftoasă, exantemul veziculos), cruste cutanate (variole). Esențialul este însă ca ele să fie prelucrate cît mai precoce după recoltare. Dacă este necesar transportul, acesta se va face numai în termose cu gheață și în recipiente sterile, pentru a evita contaminarea cu germeni bacterieni. Congelarea constituie un mijloc și mai eficient. Se poate recurge și la trimiterea acestor produse patologice în ser fiziologic glicerinat 50% neutru și steril, care conservă majoritatea virusurilor.

3. **Pentru examenul histopatologic** se va recurge la recoltarea materialelor cît mai repede după moartea sau sacrificarea animalelor. Aceasta din cauza rapidității cu care se instalează fenomenele aterative post-

mortale. În unele cazuri se procedează la recoltarea prin biopuncție sau prin biopsie.

Recoltarea se face direct în soluția fixatoare (de obicei formol 10%; în cazul turbării în acetonă), în borcănașe care au pe fund o rondelă de hîrtie de filtru sau vată, menită să împiedice aderența pieselor la fundul borcanului și să asigure procesul de fixare, din toate părțile. Bucățile de organe recoltate nu vor trebui să fie mai groase de 5 mm pentru ca fixatorul să pătrundă în profunzime. Este deosebit de important a se recolta cele mai adecvate țesuturi pentru diagnosticul urmărit. Cunoscînd localizarea leziunilor cu cea mai mare valoare diagnostică, vor fi recoltate acele organe în care acestea se găsesc cel mai frecvent. Așa de exemplu, pentru diagnosticul turbării se vor recolta porțiuni din sistemul nervos central și anume cornul lui Amon, scoarța cerebrală și cerebel, pentru diagnosticul laringotraheitei infecțioase a păsărilor se vor recolta porțiuni de mucoasă traheală, pentru diagnosticul histopatologic al variolei porțiuni cutanate sau de mucoasă cu leziuni, pentru diagnosticul anemiei infecțioase a calului porțiuni de ficat etc. Este de asemenea necesar să se recolteze segmente de organe cuprinzînd atît porțiuni modificate cît și țesut sănătos pentru ca, în preparatele ce rezultă, să se poată face comparația între țesuturile afectate și cele normale.

4. **Pentru examenul hematologic** recoltarea sîngelui se face după tehnici și locuri de elecție variabile, în funcție de specie. Ca principiu general, după asigurarea contenției, se procedează la efectuarea toaletei locului de elecție, care constă în tunderea sau raderea părului urmată de dezinfecția locului cu un tampon îmbibat în alcool-eter. Se așteaptă pînă cînd locul este perfect uscat și numai după aceea se face puncționarea sau secționarea.

Pentru puncționare și secționare se vor folosi instrumente sterilizate și perfect uscate (ace de seringă, lanțete Franke, foarfeci, bisturie etc.). Nu se va folosi același instrumentar pentru recoltarea sîngelui de la mai multe animale, succesiv, atît pentru a evita erorile de determinare, cît și pentru a evita transmiterea în serie a unor boli.

De la speciile mari (bovine, cabaline, ovine) sîngele poate fi prelevat prin puncționarea venei jugulare, cînd e vorba de cantități mai mari, sau a venei angulare a ochiului, venei auriculare medii, a suprafeței interne a buzelor precum și prin secționarea marginii pavilionului urechii, a pielii de la baza cozii, cînd e vorba de cantități mici.

De la porc, sîngele poate fi recoltat prin puncția confluenței jugularelor, a venelor mari auriculare, prin secționarea marginilor conchiei auriculare și prin amputarea vîrfului cozii.

De la cîine se poate recolta sînge din jugulare, venele ulnare sau safene, prin secționarea marginilor conchiei auriculare.

De la pisici, iepuri, cobai se recoltează sînge prin secționarea marginilor urechii, puncția venelor auriculare sau puncția cardiacă.

La șobolani și șoareci, se practică în mod obișnuit secționarea vîrfului cozii sau a arterei femurale.

Recoltarea sîngelui de la iepure, cobai, șoareci și șobolani, se mai poate face și din sinusul orbital, după metoda inițiată de Halpern



(1954). Se contenționează în așa fel animalul încît să se realizeze și staza vaselor submaxilare după care, cu ajutorul unui tub capilar de sticlă, avînd diametrul exterior de 1—1,2 mm, iar cel interior de 0,6—0,8 mm sau a unei pipete de sticlă bine efilată, care se introduc sub pleoapa a 3-a, orientate ușor oblic, spre planul sagital al capului, se pătrunde în sinusul orbital, pe o adîncime de cca 1 cm. Sîngele care se scurge în jet continuu sau în picătură prin lumenul capilarului de sticlă, se va colecta într-un recipient cu anticoagulant. Metoda este practică, relativ comodă și nu presupune riscuri (hemoragii ulterioare).

De la păsări, sîngele se poate recolta prin secționarea crestei, bărbițelor sau a membranei interdigitale (la palmipede), prin puncționarea venei ulnare sau a arterei brahiale, pe marginea anterioară a aripii, sau prin puncție cardiacă.

Indiferent de locul și modalitatea de prelevare a sîngelui, trebuie avut grijă să nu se traumatizeze zona de elecție, să se evite pe cît posibil stressarea animalelor prin contenții brutale, puncționări repetate etc. pentru a reduce la minimum modificarea unor parametri hematologici. Cantitatea de sînge ce se va recolta depinde de numărul și felul examenelor hematologice care urmează să se efectueze.

Dacă sîngele trebuie transportat la laborator în vederea efectuării diferitelor examene sau dacă natura acestora impune folosirea sîngelui necoagulat, recoltarea acestuia se va face pe un anticoagulant.

Dintre substanțele anticoagulante cu cea mai mare utilizare fac parte:

EDTA (acidul etilendiaminotetraacetic) cunoscut în comerț sub diferite denumiri — Versen, Titriplex, Sequestren, Komplexon III etc. — este unul dintre cei mai buni anticoagulanți pentru faptul că nu produce modificări ale sîngelui nici după un contact prelungit (cîteva zile), cu condiția menținerii probelor la o temperatură scăzută (5°C). Dintre numeroasele săruri pe care le formează, se pare că cele mai multe calități le întrunește sarea dipotasică (K_2EDTA) care conservă perfect morfologia celulelor sanguine. Se fac soluții în ser fiziologic sau apă distilată, în concentrații diferite (1%, 5%, 10%). Recipientele cu anticoagulant pot fi pregătite din timp și păstrate vreme îndelungată fără ca anticoagulantul să se altereze, după cum urmează:

K_2EDTA	1,0 g
Ser fiziologic 0,85%	100,0 ml

Din această soluție se repartizează în fiecare recipient (eprubete, sticluțe de penicilină etc.), cîte 0,2 ml lăsîndu-se apoi la temperatura camerei ca apa să se evapore. Cantitatea de reziduu anticoagulant uscat rămas în eprubetă, după evaporarea apei, este suficientă pentru a face necoagulabili 2 ml de sînge. În general proporția de EDTA utilizat în acest scop este de 0,5—1,0 mg/ml sînge. Este indicat să se folosească EDTA pentru oricare test hematologic, inclusiv pentru examenul morfologic al sîngelui.

Amestecul de oxalați (Wintrobe). Întrucît folosirea individuală, a unuia sau altuia din oxalați, determină modificări ale unor componente sanguine, fie sub aspect cantitativ, fie calitativ, afectînd în consecință

rezultatele examenului hematologic, s-a convenit asupra utilizării unui amestec de oxalați, care se poate obține din:

— Oxalat de potasiu	0,8 g
— Oxalat de amoniu	1,2 g
— Apă distilată	100,0 ml

Din acest amestec se utilizează 0,1 ml pentru fiecare 1 ml sînge. Amestecul se repartizează în recipiente în cantitate de 0,2 ml sau 0,5 ml (respectiv pentru 2 și 5 ml sînge), lăsîndu-se la temperatura camerei, eventual la termostat la 37°C (nu sînt indicate temperaturi mai mari căci substanțele din amestec se descompun), pînă cînd apa se evaporă complet, rămînînd numai o pulbere albă. Recipientele astfel pregătite, se astupă cu dopuri de cauciuc și pot fi păstrate timp îndelungat.

Deși amestecul de oxalați (Wintrobe) întrunește calități superioare față de fiecare oxalat în parte, el are totuși dezavantajul că nu poate fi utilizat cu bune rezultate pentru studiile de morfologie a sîngelui, întrucît produce modificări ale celulelor sanguine (vacuolizări, picnoze, aglutinarea trombocitelor etc.), fiind, din acest punct de vedere, inferior EDTA-ului. Se poate folosi însă cu rezultate eficiente în determinarea VEM, VSH, hemoglobinei, numărătoarea globulelor roșii și albe.

Heparina este un anticoagulant natural. Se poate folosi în concentrație de 0,1—0,2 mg/ml sînge pentru anumite determinări hematologice, dar nu și pentru examenul morfologic al sîngelui, pentru aceleași considerente pe care le-am menționat la oxalați. La ora actuală, atît oxalații cît și heparina tind a fi înlocuiți cu EDTA.

Rezultă, din cele prezentate, că alegerea tipului și proporției de anticoagulant trebuie făcută cu grijă, în raport cu testul care urmează a fi executat și nu la întîmplare, pentru a putea conta pe rezultate cît mai corecte.

5. **Pentru examenele serologice** se va recolta sînge în eprubete sau sticluțe sterile, în cantități variabile în funcție de specie (10 ml la animale mari, 1—2 ml la păsări), avîndu-se grija de a se numerota cu atenție tuburile și de a se identifica animalele de la care provin probele. După recoltare, sîngele se va lăsa la temperatura camerei timp de 30—60 minute, pentru a se coagula, după care se va face decolarea cheagului de pe pereții tuburilor, cu ajutorul unor baghete de sticlă sterile sau a unor anse de sîrmă flambate după fiecare probă. Apoi probele se pun la frigider pentru retractarea cheagului și pentru o mai bună exprimare a serului; serul astfel exprimat se poate folosi în reacțiile serologice.

6. **Pentru examenele micologice** recoltarea se face conform indicațiilor de la capitolul „Metode și tehnici de laborator pentru diagnosticul micozelor“.

7. **Pentru examene biochimice ale sîngelui** se vor respecta aceleași principii de recoltare ca cele de la examenul serologic. Pentru glicemie recoltarea se va face pe fluorură de sodiu (cîteva cristale), pentru a preveni glicoliza.



Examenul microscopic

Urmărește punerea în evidență a agenților animați (bacterieni, parazitari) prin examinarea la microscop a frotiurilor sau a preparatelor, ca atare, sau colorate prin diferite metode. Pentru aceasta se folosesc diferite produse:

Sîngele se pretează pentru punerea în evidență a germenilor patogeni în bolile care evoluează cu septicemie. În cursul multiplicării, ei sînt vehiculați de torentul circulator în toate țesuturile. De obicei este vorba de infecții cu evoluție acută sau supraacută și mult mai rar de cele subacute și cronice, caz în care germenii se găsesc în sînge pentru perioade scurte, numai în anumite faze. În stări de bacteriemie, traduse prin prezența temporară a germenilor eliberați din focare latente de infecție și care nu se însoțesc de manifestări clinice, proporția lor în sînge este scăzută.

Cele mai frecvente boli în care germenii pot fi găsiți și decelați în sînge sînt: antraxul septicemic, pasteureloza, salmoneloza și colibaciloza septicemică, precum și parazitozele endoglobulare (babesioza, babesieloza și anaplasmoza la taurine și ovine, babesioza și nutalioza la cabaline etc.). Momentul optim pentru decelarea acestor agenți este perioada de pirexie, cînd febra este maximă sau, dacă este posibil, chiar înaintea unui frison.

Frotiurile din sînge se fac de la animalele în viață sau, mai rar, după moarte. Grija care trebuie avută în ambele cazuri este aceea de a evita răspîndirea în mediul înconjurător a sîngelui și deci, crearea de surse de infecție pentru alte animale. Se vor efectua frotiuri subțiri, uniforme, care se vor colora apoi prin metoda Gram sau Giemsa și se vor examina cu obiectivul de imersie.

Lichidul cefalorahidian oferă date orientative prețioase în infecțiile acute și cronice septice ale meningelor (stafilococice, streptococice, leptospirice, colibacilare, tuberculoase etc.). În acest scop se vor efectua 3 frotiuri din sedimentul lichidului (sedimentul spontan sau de centrifugare) care se colorează prin metoda Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen. Streptococii hemolitici vor apărea sub formă de coci, Gram pozitivi, izolați, perechi sau în lanțuri scurte, și se pot foarte greu diferenția de stafilococi, fiind necesară diferențierea culturală. Stafilococii apar de obicei în grămezi. În meningitele tuberculoase vor apărea acidorezistenți cu morfologie caracteristică, în frotiurile colorate prin metoda Ziehl.

Laptele dă indicii asupra eventualelor procese inflamatorii ale glandei mamare, atît prin modificările însuşirilor sale fizico-chimice, cît şi prin flora bacteriană ce poate fi pusă în evidenţă în sediment. În acest scop, se va centrifuga din laptele suspect o cantitate suficientă (10—20 ml), iar din sediment se vor face frotiuri care vor fi colorate după o prealabilă degresare în eter, cu metodele obişnuite (Gram, Giemsa, Ziehl) în funcţie de suspiciune. Prin acest mijloc se poate preciza diagnosticul mamitelor stafilococice, streptococice, tuberculoase (la vacă), gangrenoase (la oaie).

Secreţiile genitale constituie substratul pentru diagnosticul bacterioscopic în procesele inflamatorii de la nivelul căilor genitale şi în special de la nivelul endometrului. În avortul produs de chlamydii la oi de exemplu, se vor face frotiuri prin amprentă din mai mulţi carunculi placentari, din mucusul de la suprafaţa avortonului şi din pulmonul sau conţinutul acestuia (din acestea din urmă şansele sînt mai reduse), iar după fixare se vor colora prin metoda Stamp şi se vor examina cu obiectivul de imersie pentru evidenţierea corpusculilor elementari. Aceştia prin metoda amintită apar coloraţi în roşu-aprins în timp ce restul bacteriilor se colorează în verde, albastru sau violet. Se poate face şi colorarea prin metoda Macchiavello în acelaşi scop.

În bruceloză, frotiuri făcute din carunculii placentari, din conţinutul cheagului avortonului, scurgerile loşiale ale vacii care a avortat, din sperma taurilor suspecţi, colorate prin metode elective (Kozlovski, Köster) pot pune în evidenţă germeni izolaţi, grupaţi sau înglobaţi în celule fagocitare, coloraţi în roşu, care contrastează cu restul elementelor celulare.

Pentru alte tipuri de infecţii, punerea în evidenţă, în frotiuri, a germenilor în cauză presupune utilizarea metodelor curente. Aşa de pildă, în salpingitele şi metritele de natură tuberculoasă, în secreţiile genitale se vor putea pune în evidenţă germenii acidorezistenţi, liberi sau înglobaţi, cu o morfologie caracteristică.

Secreţiile purulente pot fi examinate la microscop în suspiciuni de actinomicoză, actinobaciloză, gurmă, limfadenită cazeoasă, dermatită nodulară etc. În aceste cazuri se va prefera prelevarea de materii purulente din formaţiuni specifice, nedeschise (chişti, formaţiuni pe cale de abcedare) în care nu au intervenit alţi germeni de infecţie secundară. În acest scop, se va face toaleta şi dezinfecţia locală, urmată de puncţia şi extragerea de lichid purulent, din care se vor face frotiuri şi se vor colora adecvat. În cazul actinomicozei şi actinobacilozei se va recolta puroiul într-o eprubetă şi se va agita cu o soluţie de carbonat de sodiu, pentru dizolvarea mucusului, apoi se toarnă conţinutul într-o placă Petri pentru separarea granulelor formate de tufele actinomicotice şi actinobacilare caracteristice. Se iau apoi 1—2 asemenea formaţiuni, se pun între două lame şi se presează uşor, după care se examinează direct la microscop sau se colorează prin metoda Gram. *Actinomyces bovis* va apărea sub formă de filamente Gram pozitive, fine, ramificate.

În actinobaciloză se vor pune în evidenţă tufe caracteristice în rozetă, de dimensiuni mici.

În dermatita nodulară, pe frotiuri practicate din conţinutul purulent al nodulilor dermici se pot pune în evidenţă, după colorarea prin metoda Ziehl—Neelsen, germeni acidorezistenţi, în număr redus, izolaţi, mai rar fagocitaţi.

În limfadenita cazeoasă a oii prezența, în frotiurile practicate din ganglionii afectați și colorate prin metoda Gram, a unor bacili fini, polimorfi, Gram pozitivi izolați sau în grămezi confirmă diagnosticul.

Urina constituie un material, care supus examenului bacterioscopic furnizează în puține cazuri date importante, dată fiind posibilitatea contaminării ei pe traiectul căilor urinare.

În vederea examinării pe lîngă recoltarea în condiții de asepsie pe cît posibil mai riguroase, se impune a se face o centrifugare și din sediment, practicarea unor frotiuri, și colorarea lor după metodele uzuale. Trebuie specificat că prezența germenilor acidorezistenți, mai ales cînd aceștia sînt în număr redus, trebuie interpretată cu prudență, deoarece la nivelul căilor urinare se găsesc uneori și micobacterii nepatogene (mai ales *M. smegmatis*) care sînt saprofite ale mucoaselor genitale.

În cazul leptospirozei, se poate decela prezența leptospirelor în urină în cea de a doua fază a bolii — leptospiruria. În acest scop se folosește numai urina foarte proaspătă, leptospirele lizîndu-se destul de repede în pH-ul acid al urinei. După centrifugarea urinei se examinează sedimentul între lamă și lamelă direct, necolorat, în cîmp întunecat și mai rar după o colorare corespunzătoare.

Fecalele se pretează mai puțin pentru acest examen, dat fiind polimorfismul florei bacteriene care le populează. Totuși, în unele boli se folosește cu rezultate bune. Astfel, în enterita paratuberculoasă a bovinelor, frotiuri efectuate din materii fecale diareice sau, mai bine, din fecalele cu mult mucus și epitelii intestinale, permit punerea în evidență a agenților etiologici, fapt care, alături de semnele clinico-epizootologice concură la precizarea diagnosticului. Trebuie menționat însă că, datorită periodicității cu care se elimină germenii în acest caz, este necesar ca asemenea examene să se repete la interval de cîteva zile. În perioadele cînd eliminarea lor este activă, ei pot fi observați cu ușurință, datorită numărului lor mare și dispoziției în grămezi.

Mai ușor de decelat în fecale sînt bacilii tuberculozei aviare, ei eliminîndu-se în cantități imense, mai ales cînd există și localizări intestinale, dar și în cele hepatice, cînd ei sînt deversați în lumenul intestinului pe cale biliară. În acest caz, se face un frotiu fie direct din materiile fecale, fie, preferabil, din sedimentul de centrifugare obținut din filtratul (prin vată sau tifon) suspensiei de materii fecale. Această din urmă soluție are avantajul că permite concentrarea materialului de examinat dintr-o cantitate mai mare de fecale, rezultatele fiind mai sigure. Pentru aceasta se recoltează materiile fecale de la păsările suspecte, se suspensionează și omogenizează bine în ser fiziologic, după care se filtrează prin vată sau chiar prin hîrtie de filtru, pentru a obține un lichid debarasat de materiile alimentare. Filtratul se supune centrifugării, 10 minute la 3000 t/minut și din sediment se fac frotiuri care apoi se colorează prin metoda Ziehl—Neelsen.

În disenteria porcului, produsă de *Treponema hyodisenteriae*, preparate efectuate din fecalele porcilor bolnavi sau, în cazul cadavrelor, din raclatele de mucoasă de la nivelul colonului spiralat, examinate direct, sau, preferabil după colorarea prin metoda Tribondeau—Fontana, permit evidențierea agentului etiologic.

De asemenea, în cazul disenteriei produsă de *Vibrio coli,* la aceeași specie, preparate din fecale sau raclatele de mucoasă de la nivelul ileonului, examinate după o prealabilă colorare negativă, permit observarea vibrionilor cu aspect curbat, în formă de virgulă sau în S.

Tehnica efectuării frotiurilor

Frotiul este un preparat expeditiv, efectuat din diferite produse patologice (sînge, lichide patologice, organe etc.), sau din culturi ale diferiților germeni, preparat care permite punerea în evidență a formațiunilor celulare și cercetarea însușirilor lor morfologice și tinctoriale.

Tehnica efectuării frotiurilor diferă în funcție de materialul din care se practică și de natura germenilor în cauză.

Din lichide frotiurile se realizează prin întinderea materialului respectiv în strat subțire, cu ajutorul unei anse bacteriologice sau a unei lame șlefuite, pe lame de microscop obișnuite. Pelicula de material patologic este recomandabil să fie cît mai fină și să aibă o întindere mai redusă decît marginile lamei de microscop. Dacă se presupune că lichidul respectiv conține o cantitate redusă de elemente celulare, se poate realiza o concentrare a acestora prin centrifugare, frotiul practicîndu-se din sediment.

Dacă este vorba de frotiuri ce se practică din culturi, în cazul mediilor lichide, frotiul se face cu ansa bacteriologică, sau cu pipeta Pasteur, direct din mediul de cultură, iar în cazul mediilor solide se face prelevarea cu ansa bacteriologică a unei cantități reduse de cultură care se emulsionează bine într-o picătură de apă distilată, pusă în prealabil pe o lamă de microscop bine degresată și apoi se întinde suspensia în strat subțire.

În cazul culturilor în medii solidificate în poziție verticală (de exemplu geloza Veillon) se recurge la o pipetă Pasteur la care se adaptează un tub de cauciuc, în așa fel ca el să permită manipularea pipetei în profunzimea mediului sub control vizual. Materialul microbian se recoltează prin aspirarea coloniilor izolate, care se găsesc în diferite puncte ale mediului.

— *Din organe,* frotiul se poate realiza în mod diferit în funcție de natura acestora. Cel mai frecvent se face prin aplicarea unei lame de microscop pe suprafața de secțiune a organului de cercetat, în acest fel rămînînd o impresiune corespunzătoare formei suprafeței atinse (metoda prin amprentă). Este bine ca pe aceeași lamă să se practice mai multe asemenea amprente, pentru a se putea examina frotiurile mai subțiri (ultimele amprente sînt întotdeauna mai fine).

Se poate recurge, de asemenea, la glisarea unei porțiuni de organ, tăiată geometric, pe suprafața unei lame de microscop, avîndu-se grija de a nu se atinge marginile lamei. Și în acest caz se preferă frotiurile cît mai fine.

Uneori, frotiurile se execută prin strivirea între două lame (în cazul leziunilor de tip nodular, cum sînt cele din tuberculoză). În acest scop, se depune o formațiune nodulară suspectă pe o lamă și cu o a doua se strivește prin compresiune.

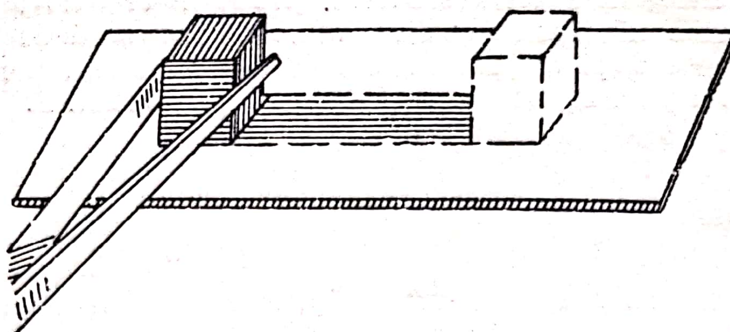


Fig. 11 — Efectuarea frotiului din organe

În cazul unor organe bogate în lichide (sînge, exsudate) frotiul se poate face prin depunerea cu ajutorul unei anse bacteriologice sau a unei pipete Pasteur pe lama de microscop a unei cantități reduse de material patologic și etalarea lui în strat subțire.

Frotiurile astfel obținute se fixează după uscare la flacără și se colorează. Fixarea este necesară pentru a realiza o bună aderență a materialului patologic pe lamă și implicit evitarea desprinderii de către soluțiile colorante a materialului de examinat pe de o parte și inactivarea germenilor etalați pe de alta. Fixarea se poate obține prin mijloace termice sau chimice.

Fixarea termică presupune trecerea frotiului uscat de 3—4 ori prin flacăra unui bec de gaz sau a unei lămpi cu alcool, avînd grija ca lama să fie orientată spre flacără cu partea opusă celei pe care s-a etalat materialul. Viteza de trecere este moderată, în așa fel ca în final temperatura lamei să fie în jur de 60°C.

Fixarea termică se poate face și prin flambare, punînd pe frotiu cîteva picături de alcool etilic, metilic sau alcool-acetonă (din bateria de colorare Gram) și dîndu-li-se foc imediat după scurgerea excesului de alcool.

Fixarea chimică se realizează prin folosirea unor substanțe fixatoare (alcool etilic, amestec de alcool etilic, eter și alcool metilic). Acestea se pun în cantitate suficientă pentru a acoperi pelicula de material de pe lamă și se lasă pînă la evaporarea totală.

Trebuie menționat că unii coloranți (de exemplu soluția Giemsa din metoda cu același nume sau soluția Ruge din metoda Tribondeau—Fontana) au și capacitatea de a fixa frotiurile, așa încît în acest caz nu mai este necesară fixarea prealabilă.

După fixarea și răcirea frotiului urmează colorarea, care este bine să se facă cît mai curînd după efectuarea frotiurilor.

Metodele cele mai importante de colorare pentru examenul bacteriologic

Prin colorare se pot stabili unele particularități morfologice ale germenilor (dimensiuni, formă, afinități tinctoriale) ca și relațiile cu țesuturile în care se află, facilitîndu-se în acest fel precizarea diagnosticului.

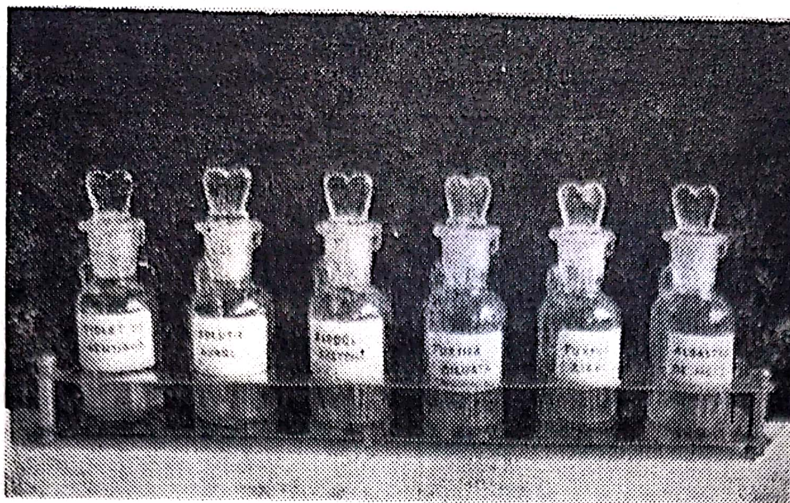


Fig. 12 — Baterie de colorare

Metodele de colorare sînt diverse și se aplică în mod diferențiat, în funcție de scopul urmărit. Există metode care se aplică în mod curent și metode speciale, mai pretențioase și aplicate numai în anumite situații.

Colorația Gram se folosește pentru diferențierea germenilor Gram pozitivi de cei Gram negativi din frotiurile efectuate din diferite țesuturi sau din culturi microbiene. Este o metodă de bază în practica bacteriologică. Ea constă în:

— colorare cu soluție de violet de Gențiana 1% timp de 1 minut
— vărsarea colorantului de pe lamă
— tratarea frotiului cu soluție Lugol timp de 2 minute
— decolarea cu amestec de alcool-acetonă ($\overline{aa}$) pînă cînd amestecul ce se scurge de pe lamă nu mai este colorat
— spălare cu apă de robinet
— recolorare cu fucsină diluată 1/10 timp de 20—30 secunde
— spălare cu apă de robinet
— uscare
— examinarea la microscop.

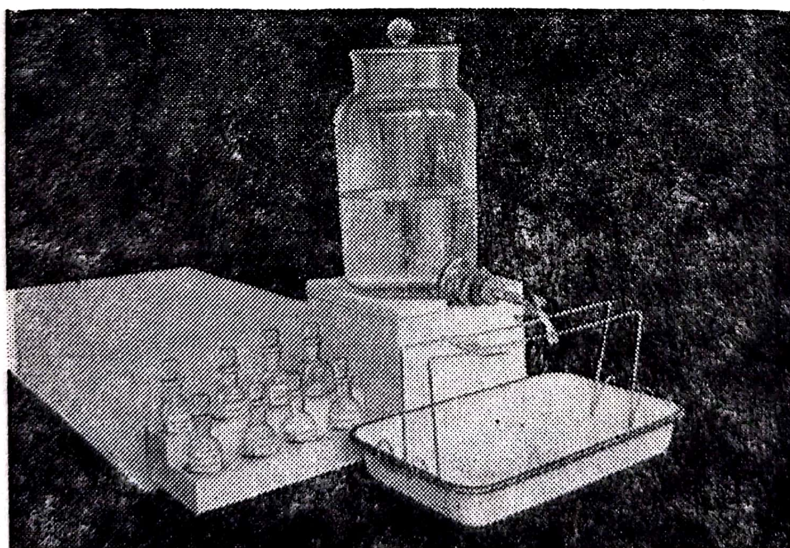


Fig. 13 — Baterie de colorare a frotiurilor

Germenii Gram pozitivi vor apărea colorați în albastru-violet iar cei Gram negativi în roșu. Această diferență de colorare rezultă din faptul că germenii Gram pozitivi fixează violetul de Gențiana în așa fel încît prin tratarea cu soluția de alcool-acetonă nu se decolorează, în timp ce cei Gram negativi se decolorează și apar ca urmare colorați în roșu cu cel de al doilea colorant (fucsina diluată). Sporii bacterieni apar sub formă de vacuole.

Colorația cu albastru de metilen (Löffler). Se folosește pentru punerea în evidență a germenilor într-un material patologic, fără a-i diferenția sub raportul afinității lor tinctoriale.

În acest scop se acoperă frotiul fixat cu o soluție de albastru de metilen 3% și, după 2—5 minute, se spală cu apă, se usucă, se examinează. Germenii vor apărea colorați în albastru, uniform. Metoda permite și observarea unor particularități morfologice cum ar fi prezența capsulei și sporului. Capsula se colorează în roz-pal, iar sporul apare sub forma unei vacuole.

Colorația Ziehl—Neelsen. Se folosește pentru punerea în evidență a germenilor acidorezistenți, care nu se colorează prin metodele obișnuite (mai ales micobacteriile):

— acoperirea frotiului, în prealabil fixat la flacără, cu soluție de fucsină Ziehl

— încălzirea la flacără pînă la apariția vaporilor și menținerea prin încălziri repetate timp de 5—10 minute (se va avea grijă ca soluția colorantă să nu fiarbă și să se completeze în caz că s-a evaporat de pe anumite porțiuni de frotiu)

— vărsarea colorantului

— decolorarea cu o soluție de acid sulfuric 1/4 sau acetic 1/3, timp de cca 2 minute

— spălare cu apă

— tratare cu alcool absolut timp de 5 minute

— spălare cu apă

— recolorare cu soluție de albastru de metilen 1% timp de 2—3 minute

— spălare cu apă

— uscare și examinare cu imersie.

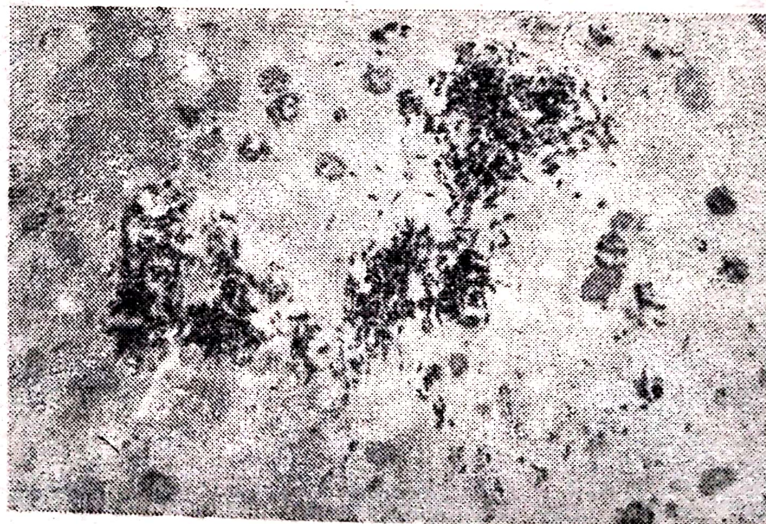


Fig. 14 — **Bacili tbc în frotiu din organe cu leziuni**

La examenul frotiurilor, germenii se pot prezenta colorați în roșu (acidorezistenți) sau în albastru (neacidorezistenți). Primii fixează fucsina Ziehl și nu se decolorează sub acțiunea acidului, în timp ce secunzii se decolorează sub influența tratării cu acid. Acidorezistența rezidă în structura chimică particulară a peretelui celular al germenilor, în sensul că în cazul acidorezistenților acesta fiind bogat în substanțe lipoide împiedică pătrunderea acidului decolorant ca dealtfel și a coloranților (fucsina pătrunde datorită concentrației ridicate și a căldurii). Pentru acest motiv, germenii acidorezistenți nu sînt colorabili prin metode obișnuite.

Colorația Ziehl—Neelsen modificată, în vederea diferențierii micobacteriilor patogene de cele saprofite:

— colorare cu fucsină Ziehl, prin încălzire repetată, pînă la apariția vaporilor, timp de 5—10 minute
— vărsarea colorantului de pe lamă
— decolorarea cu acid sulfuric 1% cca 2 minute
— spălare cu apă
— tratare cu alcool absolut timp de 5 minute
— spălare cu apă
— colorare cu soluție de violet de Gențiana 1%, timp de 30 secunde
— tratare cu soluție Lugol timp de 30 secunde
— clătire în alcool etilic 96°, de mai multe ori, pînă cînd lichidul ce se scurge de pe frotiu nu mai conține colorant
— colorare cu soluție de verde de malahit 2%, timp de 10 secunde
— clătire, uscare, examinare.

Micobacteriile patogene apar colorate în roșu, în timp ce cele nepatogene vor fi colorate în violaceu.

Colorația Köster. Se folosește pentru colorarea brucelelor:

— fixarea frotiurilor la flacără
— colorarea timp de 1 minut cu soluție alcalină de safranină preparată ex tempore din 5 picături soluție apoasă 3% de safranină și 1,5 ml soluție de KOH 5,6%
— spălare cu apă de robinet
— diferențierea cu soluție de acid sulfuric 0,05% timp de 15 secunde
— spălare cu apă de robinet
— recolorare cu albastru de metilen 3% timp de 15 secunde
— spălare, uscare, examinare.

Prin această metodă electivă, dar nu specifică, brucelele vor apărea colorate în roșu, în timp ce restul elementelor celulare și bacteriene, cu excepția acidorezistenților, în albastru.

Metoda Koslovski. Se folosește pentru colorarea brucelelor;

— frotiul fixat se acoperă cu o soluție apoasă 2% safranină și se încălzește pînă la apariția vaporilor; se menține timp de 1 minut la această temperatură;
— spălare cu apă
— recolorare cu soluție apoasă 1% de verde de malahit sau verde brillant
— spălare cu apă
— uscare, examinarea la obiectivul cu imersie.

Brucelele vor apărea colorate în roz în timp ce alți germeni în verde.

Metoda selectivă recomandată de O.M.S. pentru colorarea brucelelor. Este folosită în special pentru punerea în evidență a brucelelor în materialele patologice:

— colorare cu soluție de fucsină diluată 1/10 timp de 1 minut
— diferențierea cu soluție de acid acetic 0,5% timp de 30 secunde
— spălare cu apă distilată prin acoperirea frotiului timp de 1—3 minute
— colorare cu soluție de albastru de metilen 1% timp de 30 secunde
— spălare cu apă distilată
— uscare, examinare la obiectivul cu imersie.

Germenii din genul *Brucella* apar colorați în roșu aprins, iar cei aparținînd altor genuri se colorează în albastru.

Metoda Tribondeau—Fontana. Se folosește pentru colorarea leptospirelor și constă în impregnarea argentică. Sînt necesare trei soluții:

— Soluția Ruge:

— formol	2,0 ml
— acid acetic glacial	1,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

— Soluția mordantă:

— acid tanic	5,0 g
— fenol	1,0 g
— apă distilată	100,0 ml

— Soluția argentică Fontana:

— azotat de argint	5,0 g
— apă distilată	100,0 ml

La 80 ml din soluția argentică Fontana se adaugă picătură cu picătură soluție concentrată de amoniac. Se formează un precipitat brun, dens. Se adaugă amoniac în continuare pînă ce precipitatul se dizolvă și amestecul devine limpede. La acest amestec se adaugă, tot picătură cu picătură, soluție de azotat de argint 5%, pînă cînd devine ușor opalescent. Astfel pregătită, soluția poate fi păstrată 1—2 luni.

Tehnica de colorare:

— frotiul, uscat, se acoperă cu soluția Ruge (fixare) timp de 5 minute; se repetă fixarea de 2—3 ori
— spălare cu alcool
— se acoperă lama cu soluția mordantă și se încălzește pînă la apariția vaporilor
— spălare cu apă
— se acoperă frotiul cu soluție argentică Fontana și se încălzește la flacără pînă la apariția vaporilor, timp de 20—30 secunde (frotiul trebuie să ia un aspect metalic brun); se poate repeta impregnația de 2—3 ori
— spălare cu apă distilată
— uscare
— examinare la obiectivul cu imersie.

Leptospirele apar colorate în brun-negru, iar fondul în galben.

C o l o r a r e a   c a p s u l e i   b a c t e r i e n e. **Colorația Giemsa.** Preparatul se colorează timp de 20—30 minute cu soluție Giemsa (diluată în proporție de 0,5 ml soluție Giemsa la 10 ml apă distilată neutră la pH 7,2), se spală cu apă distilată, se usucă și se examinează.

Capsula se colorează în diferite nuanțe de roz pînă la violaceu, iar corpul bacterian în violet-închis. Adesea capsula nu se colorează dife-

rențiat de corpul bacterian, așa încît prezența ei se deduce după mărimea diametrului transversal al germenului capsulat în comparație cu cei necapsulați.

Colorarea simplă cu albastru de toluidină. Frotiul, fixat la flacără sau prin flambare cu alcool, se acoperă cu o soluție de albastru de toluidină, care se lasă pe lamă timp de 1—2 minute. Se varsă, se spală, se usucă și se examinează la imersie.

Capsula apare colorată în roz, iar corpul bacterian în albastru. Dă rezultate mai bune în cazul frotiurilor efectuate din organe, la scurt timp după moarte.

Metoda de colorare negativă a capsulei cu tuș de China. Pe o lamă de microscop se pune o picătură de ser fiziologic în care se suspensionează germenii de examinat, iar alături se pune o picătură de tuș de China și se omogenizează în suspensia bacteriană. Din amestec se fac apoi frotiuri cu ajutorul unei lame șlefuite sau cu ansa bacteriologică.

După uscare, se fixează frotiurile, se colorează timp de 1—2 minute cu o soluție de albastru de metilen Löffler. Se varsă colorantul, se spală cu apă și se usucă.

La examinare, pe fondul negru colorat cu tuș, apar germenii colorați în albastru. Între fond și corpul bacterian se observă o zonă clară, necolorată, care corespunde capsulei.

Metoda se folosește mai ales pentru punerea în evidență a capsulei germenilor din specia *Clostridium perfringens* și a germenilor capsulați din culturi.

Colorarea sporilor. Metoda Möller — fixare cu alcool absolut 2 minute

— tratare cu vapori de acid osmic 5 minute
— spălare cu apă de robinet
— colorarea cu fucsină Ziehl, prin încălzire de 3 ori pînă la emiterea de vapori
— decolorarea rapidă cu soluție de acid azotic 1/4
— spălare cu apă de robinet
— recolorare cu albastru de metilen 1% timp de 2 minute
— spălare cu apă
— uscare.

Sporii apar colorați în roșu, iar bacilii în albastru.

Metoda Pooman — colorare cu fucsină Ziehl, prin încălzire de 2—3 ori pînă la apariția vaporilor

— decolorare cu acid sulfuric 1‰
— spălare cu apă
— recolorare cu albastru de metilen alcalin, timp de 2 minute
— spălare cu apă, uscare.

La examinare, sporii apar colorați în roșu, iar formele vegetative în albastru.

Metoda cu verde de malahit — frotiurile fixate prin căldură se acoperă cu o soluție de verde de malahit 5%

— se încălzește pînă la apariția vaporilor, se lasă să se răcească, se îndepărtează colorantul; se repetă operația de 3 ori punînd de fiecare dată colorant proaspăt
— se lasă să se răcească lama
— se spală cu apă de robinet

— se recolorează cu fucsină diluată 1/10 timp de 30 secunde
— se spală, se usucă şi se examinează la imersie.

Formele vegetative vor apărea colorate în roz-roşu iar sporii în verde.

Colorarea cililor. **Metoda Casares—Gill.** Foloseşte fucsina Ziehl şi o soluţie mordantă. Soluţia mordantă se prepară prin mojararea a 10 g tanin şi 18 g clorură de aluminiu lichidă în 33 ml alcool de 70°. Într-un alt mojar se dizolvă 10 g clorură de zinc şi 1,5 g fucsină bazică în 10 ml apă distilată. Cele două soluţii se amestecă vărsînd picătură cu picătură cea de a doua soluţie în prima. Păstrarea soluţiei se poate face la întuneric şi rece, vreme îndelungată.

În vederea colorării, pe o lamă bine degresată se pune o picătură de ser fiziologic în care urmează să se facă suspensia de germeni, cu foarte lente mişcări, dată fiind fragilitatea deosebită a cililor, care se desprind cu uşurinţă. După uscare la aer se obţine frotiul propriu-zis. Pentru obţinerea unor imagini mai clare se poate recurge la suspensionarea prealabilă a germenilor în apă distilată şi ţinerea la 37°C timp de 2 ore, din suspensia respectivă efectuîndu-se frotiul.

Frotiul se acoperă cu soluţia mordantă, diluată 1/5 (1 parte mordant la 4 părţi apă distilată) şi filtrată extemporaneu. Soluţia se ţine pe lamă pînă la apariţia unui luciu metalic, după care se varsă. Se pune apoi fucsină Ziehl, care se lasă să acţioneze 1—2 minute, se varsă, se spală, se usucă şi se examinează.

Corpii bacterieni apar coloraţi în roşu, iar cilii în roz-pal.

Determinarea dimensiunilor bacteriilor

Poate fi făcută cu oarecare aproximaţie prin comparaţie cu diferite elemente avînd dimensiuni cunoscute sau folosindu-se metode micrometrice.

Metoda comparaţiei foloseşte în special elementele eritrocitare, al căror diametru este în general de 7,7—8 microni. În acest scop se amestecă o suspensie bacteriană în ser fiziologic cu o picătură de sînge. Din amestec se face un frotiu care se colorează şi se examinează. Metoda are doar o valoare orientativă.

Metoda micrometrică permite aprecieri mai exacte şi foloseşte dispozitive speciale din sticlă, pe care sînt gravate scări gradate şi care se adaptează la microscop (micrometrul ocular montat sub lentila superioară a ocularului şi micrometrul obiectiv, aşezat pe platina microscopului). Micrometrul obiectiv se reglează astfel încît liniile zero ale celor două micrometre să se suprapună. Apoi se notează care din diviziunile celelalte se suprapun. Valoarea găsită la micrometrul obiectiv se înmulţeşte cu 10 (valoarea în microni a unei diviziuni) şi se împarte la valoarea de pe scara micrometrului ocular, obţinîndu-se valoarea în microni a unei diviziuni de pe micrometrul ocular, cu care se fac apoi determinările. Micrometrul obiectiv se scoate de pe platina microscopului şi se pune preparatul de examinat. Numărul de diviziuni ocupat de formaţiunea bacteriană sau celulară ce urmează să fie determinată, se înmulţeşte cu cifra corespunzătoare valorii în microni a unei diviziuni a micrometrului ocular, determinîndu-se astfel mărimea formaţiunii respective.

Examenul bacteriologic

Examenul bacteriologic presupune izolarea, cultivarea și identificarea germenilor bacterieni din diferite produse patologice suspecte. Față de examenul microscopic, care permite decelarea prezenței agentului etiologic, metodele bacteriologice complexe permit, pe lîngă izolare, și cercetarea diferitelor însușiri biologice care-l caracterizează și pe baza cărora se poate afirma cu certitudine natura procesului patologic și se pot orienta corect măsurile terapeutice de combatere în focar și de profilaxie. Faptul are o deosebită importanță și din punct de vedere epidemiologic, prin aceste examene evitîndu-se, de exemplu, darea în consum a unor produse animaliere care pot provoca la om infecții sau toxiinfecții, uneori cu evoluție gravă. Este suficient să se amintească pericolul pe care-l prezintă, mai ales carnea animalelor sacrificate de necesitate, la care întreruperea procesului patologic, prin sacrificare, face ca modificările organoleptice și organice să nu trezească suspiciune la examinare. Un examen bacteriologic însă poate pune în evidență agenții unei salmoneloze, ai tularemiei, leptospirozei, antraxului etc. toate transmisibile la om. Examenul bacteriologic dă adesea și indicii referitoare la sursa de infecție și permite deci, eliminarea ei. Așa de exemplu, identificarea la animalele tuberculino-pozitive sacrificate, a tipului aviar de bacil al tuberculozei, arată că există o sursă de infecție cu acest tip, care, dacă se elimină, se obține cu ușurință asanarea efectivului. De asemenea dacă se izolează tipul uman, simpla îndepărtare din sectorul zootehnic a persoanei eliminatoare de bacili se soldează cu autoasanarea efectivului, transmiterea interbovină a acestui tip de infecție nerealizîndu-se de regulă.

Depistarea infecției cu *Salmonella typhimurium* la bovine dă indicii cu privire la posibilitatea contractării infecției de la rozătoarele din adăposturile respective.

Produsele patologice folosite pentru punerea în evidență a germenilor bacterieni sînt în principiu aceleași ca și la examenul microscopic.

Sîngele. Cînd se folosește pentru cultivarea unor germeni eventual prezenți în el, se realizează așa-numita hemocultură. În acest scop, se va recolta sînge de la animalele suspecte, în mod steril, în eprubete cu anticoagulant sau cu perle de sticlă și se însămînțează pe medii corespunzătoare. Trebuie avută în vedere o proporție optimă a sîngelui față de mediul respectiv, pentru a asigura, pe de o parte, neutralizarea efectului bactericid al sîngelui, și pe de alta, condițiile nutritive proprii unei dez-

voltări optime. Această proporţie este de 1/20, 1/30. Pentru a bloca acţiunea fagocitară a leucocitelor conţinute de sîngele însămînţat se poate recurge şi la un adaos de saponină în proporţie de 2% (2 ml saponină 1% la 100 ml lichid). Dacă individul de la care provine sîngele de examinat a fost supus unui tratament cu penicilină sau sulfamide, este necesar să se adauge 5 mg acid paraaminobenzoic la 100 ml mediu care să neutralizeze efectul inhibitor al acestora.

Se poate practica şi hemocultura din coagul de sînge, mai ales în cazul unor microbi mai greu de izolat sau cînd metodele precedente nu au dat rezultate (de exemplu brucele). În acest scop, o cantitate de 10 ml sînge, recoltat în condiţii de asepsie perfectă, se lasă să se coaguleze, apoi se înlătură serul exprimat şi, în condiţii de sterilitate riguroasă (la flacără sau în boxă sterilă), se toarnă coagulul într-un flacon cu 100 ml mediu licihd. Incubaţia, la 37°C şi eventual în atmosferă îmbogăţită în CO_2, se urmăreşte circa o lună, practicîndu-se periodic subculturi.

Lichidul cefalorahidian se însămînţează pe medii diferite, în funcţie de suspiciune, în cantitate de cel puţin 0,5 ml. În mod obişnuit se fac însămînţări pe bulion glucozat şi pe plăci cu sînge gelozat. Dacă se suspicionează meningite tuberculoase, se vor face însămînţări pe medii selective (Löwenstein-Jensen este cel mai folosit), după prealabilă tratare alcalină, pentru distrugerea eventualei flore secundare. În cazul leptospirozei se are în vedere că leptospirele pot fi decelate la acest nivel numai în faza de leptospiremie, deci în prima săptămînă de boală.

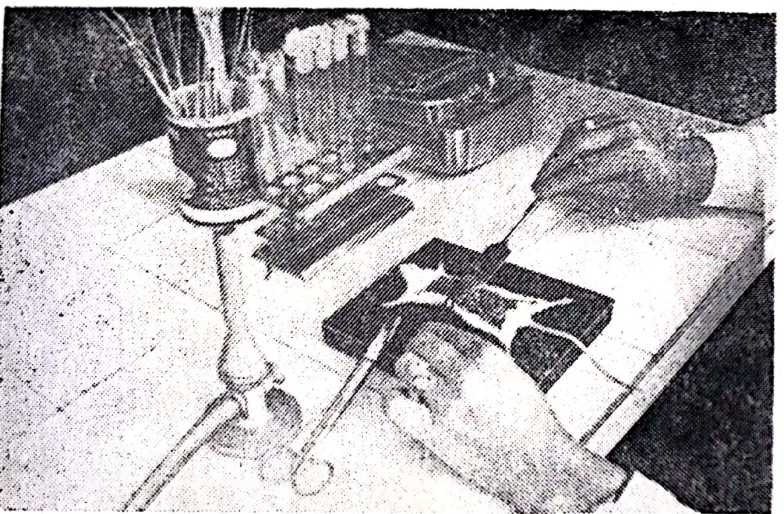
Urina este preferabil să se recolteze prin cateterism pentru a evita contaminarea de pe căile urinare. Faptul este desigur posibil la femele şi foarte dificil la masculi. Înainte de recoltare este bine să se suspende administrarea de antibiotice sau chimioterapice, urmele acestora avînd o acţiune inhibitoare în dezvoltarea germenilor. Însămînţările se vor face cît mai repede după recoltare, pentru a împiedica multiplicarea eventualilor germeni de contaminare.

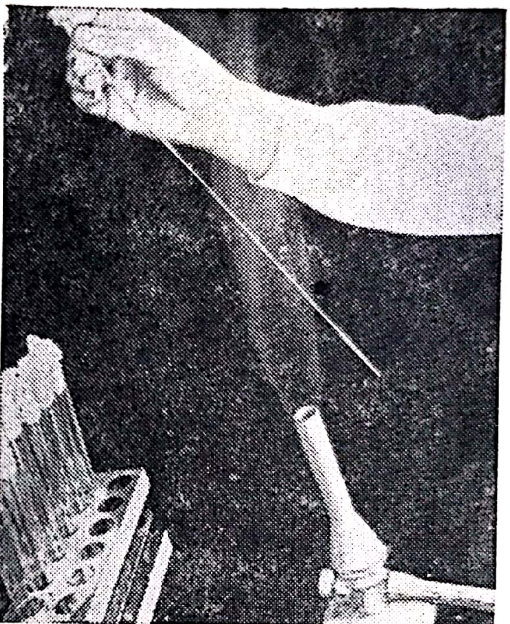
Pentru aceasta se vor însămînţa, direct, 3—4 picături de urină luate cu pipeta Pasteur, pe suprafaţa unei plăci cu geloză simplă şi una cu geloză cu sînge, după care se dispersează cu ansa pe toată suprafaţa mediului.

Se iau apoi 10 ml urină şi se centrifughează 10 minute la 3000 t/minut, iar din sediment se procedează la o nouă însămînţare pe o placă cu geloză-sînge şi pe bulion glucozat. Cînd se suspectează un anumit tip de infecţie se poate recurge încă din această etapă la medii speciale (Drigalski pentru *E. coli* şi salmonele, Löwenstein—Jensen pentru bacili ai tuberculozei, mediul Korthoff pentru leptospire). În cazul leptospirozei se are în vedere că leptospirele se elimină prin urină numai după 8 zile de la debutul bolii. Uroculturile ce se practică în acest scop, este bine să fie precedate de o dietă alcalină, care să evite lizarea leptospirelor în mediul acid al urinei. Însămînţarea se face din sedimentul de centrifugare pentru a explora o cantitate cît mai mare de urină. Incubarea tuburilor însămînţate se face la 28—30°C, controlîndu-se apariţia leptospirelor în cultură la microscop, din 5 în 5 zile, timp de două luni.

În momentul în care se observă apariţia leptospirelor în mediu, se fac pasaje pe alte medii, noi.

Organele, prin conţinutul lor bogat în germeni, se pretează pentru izolarea acestora în condiţii foarte bune. Avînd în vedere însă rapidita-


A


B

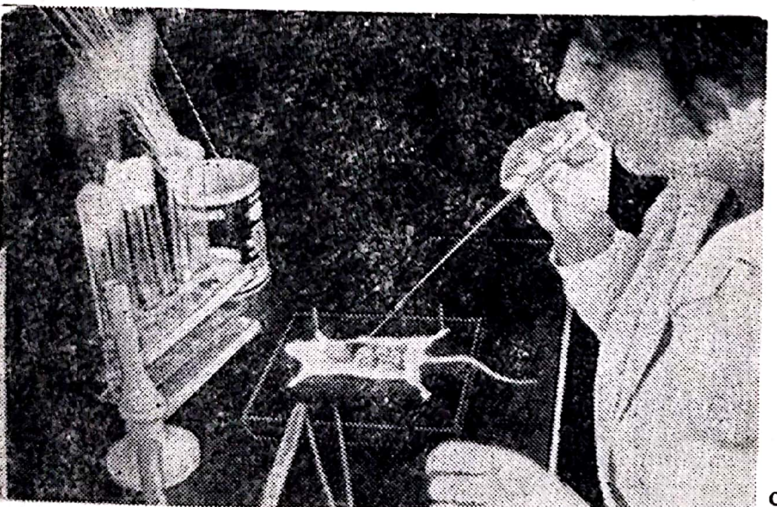

C

Fig. 15 — Efectuarea însămînțării din organe
A — cauterizarea suprafeței organului; *B* — flambarea pipetei Pasteur; *C* — recoltarea materialului patologic cu ajuorul pipetei Pasteur

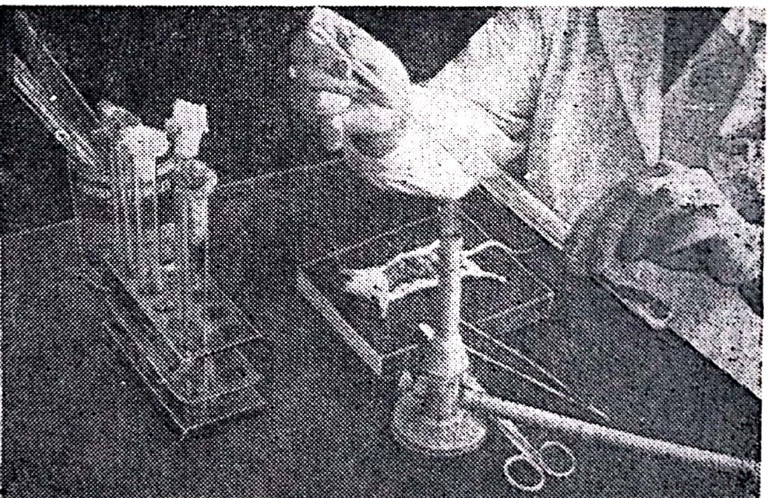


Fig. 16 — Însămînțarea pe medii de cultură

tea cu care se multiplică germenii de putrefacție și saprofiții, care în perioada de agonie difuzează pe cale circulatorie, este necesar să se efectueze însămînțările cît mai repede după moarte și să se aleagă în acest scop organele care se pretează în cel mai înalt grad pentru izolarea germenilor. Unul dintre țesuturile care conferă o garanție că germenul izolat este incriminat în procesul patologic dat, este măduva osoasă. În acest țesut, complet izolat prin peretele osos, de mediul înconjurător, germenii ajunși pe cale circulatorie pot fi izolați de cele mai multe ori în stare pură; prezența lor denotă o septicemie și, cu mare probabilitate, determină și agentul etiologic. Urmează apoi cordul, care de asemenea este locul de unde, în caz de septicemie sau chiar numai de bacteriemie, se pot izola germenii în stare pură. Există situații în care agentul cauzal poate fi izolat numai de la nivelul unor anumite țesuturi, unde se localizează cu predilecție. Astfel, listeriile, la specia ovină, pot fi izolate mai ales de la nivelul sistemului nervos central; bacilii rujetului în formele cronice de endocardite, de la nivelul vegetațiilor endocardice; salmonelele abortigene mai ales din avortoni (conținutul stomacal, intestinal, bilă, al acestora); *Cl. chauvoei* de la nivelul tumorii emfizematoase musculare, *Cl. perfringens* din conținutul intestinal și din ganglionii mezenterici etc.

Ca tehnici de însămînțare pot fi aplicate mai multe procedee:

a) *Cu pipeta Pasteur.* Se cauterizează suprafața organului cu o spatulă încălzită, se extrage cu ajutorul unei pipete Pasteur, flambată și ea și răcită, o cantitate de lichid organic din profunzime și se însămînțează întîi pe mediul lichid (bulion), iar apoi pe mediul solid (agar înclinat, agar cu sînge, agar cu ser etc.). În cazul oaselor lungi, se flambează temeinic suprafața de secționare și, cu pipeta Pasteur, se extrage prin mișcări repetate de du-te-vino spre profunzime, lichid din măduva osoasă, care se introduce apoi în mediile de cultură. Se înțelege că la închiderea și deschiderea tuburilor se iau toate măsurile de asigurare a sterilității, flambînd gura lor imediat după deschidere și înainte de închidere.

b) *Cu ajutorul acului de însămînțare drept.* Se cauterizează suprafața organului și se sterilizează acul prin încălzire la roșu (tija se trece și ea de 3 ori prin flacără), iar după răcire se înțeapă organul prin suprafața cauterizată, făcînd cîteva mișcări spre interior. Se scoate acul din organ și se face însămînțarea prin clătirea acestuia în mediul lichid. Fără a se flamba, acul se introduce apoi în tubul cu mediul solid, făcîndu-se pe suprafața acestuia mișcări în zig-zag, începînd de la baza mediului spre partea superioară, sau se clătește acul în lichidul de condensare, după care se umectează întreaga suprafață a mediului cu acest lichid, prin înclinări repetate. După fiecare probă, acul se sterilizează prin înroșire la flacără.

c) *Cu porțiuni de organ.* Cînd organul a fost recoltat în condiții de sterilitate (mai ales în cazul animalelor mici) se poate recurge la secționarea unor bucăți cu ajutorul unor instrumente sterile, iar cu una din suprafețele secțiunii se dispersează materialul patologic pe suprafața unei plăci cu mediu. În unele laboratoare această tehnică este folosită aproape în exclusivitate.

d) *Prin introducerea directă în mediu a porțiunilor de organ.* Metoda se folosește mai rar, în special cînd se bănuiește sărăcia în germeni a

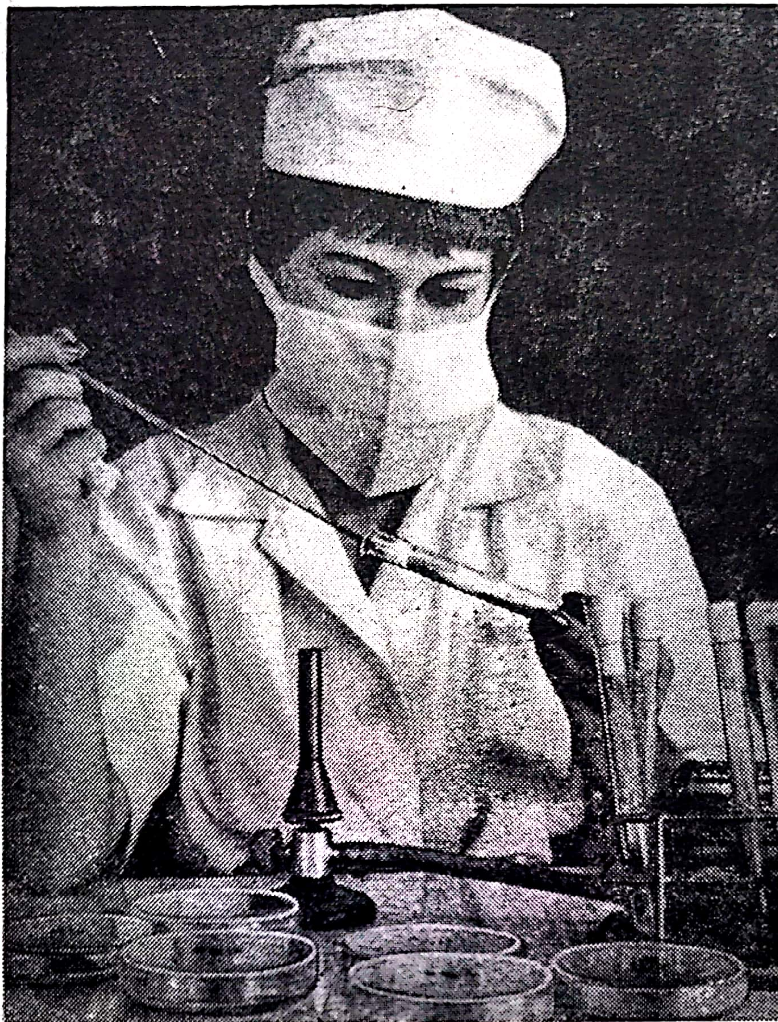


Fig. 17 — Tehnica însămînțării

materialului patologic. Recoltarea și manipularea acestuia trebuie să se facă în condiții de sterilitate perfectă.

Ca principiu general, se va evita deschiderea organelor sau secționarea țesuturilor înainte de recoltarea materialului pentru examenul bacteriologic.

— *Secrețiile* (nazală, oculară, mai rar salivară) se însămînțează direct cu tamponul steril, cu care au fost recoltate, atît pe mediile lichide, cît și pe cele solide. Se poate recurge și la spălarea tampoanelor respective în ser fiziologic steril, din care apoi se fac însămînțările pe aceleași medii.

— *Transsudatele și exsudatele* se supun de preferință unei centrifugări obișnuite (3000 T/minut timp de 10 minute în tuburi de centrifugă sterile), iar din sediment se vor practica însămînțările de rigoare.

Tehnica transplantărilor. Are ca scop fie izolarea din culturile mixte a diferiților germeni în stare pură, fie menținerea lor în timp, în condiții de laborator (tulpini de colecție).

Din culturile pe medii lichide, transplantarea se face cu pipeta Pasteur sau cu ansa de însămînțare. În primul caz, se recoltează o cantitate

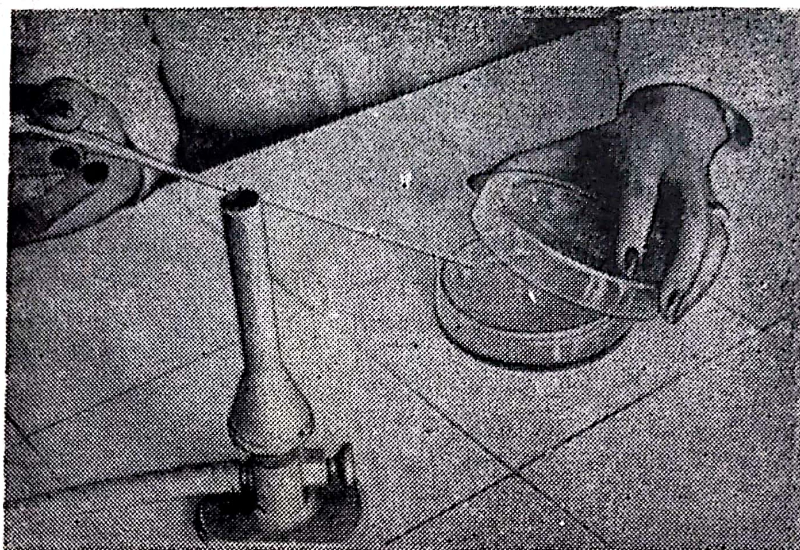


Fig. 18 — Însămînţarea în placa Petri cu agar

arbitrară (cîteva picături) din cultura veche, care apoi se însămînţează în mediul proaspăt. În cel de al doilea, se introduce ansa flambată şi răcită în cultura veche, după care se face însămînţarea pe mediile proaspete (întîi în mediul lichid şi apoi în mediul solid, dacă e cazul).

Din culturile pe medii solide, transplantarea se face cu ansa, raclînd o cantitate foarte redusă de cultură, care apoi se depune pe mediile proaspete.

În timpul însămînţărilor, de orice natură, este necesar să se aibă în vedere cîteva reguli general valabile:

— însămînţările se execută în boxe sterile sau în hote speciale, care permit sterilizarea periodică şi nu permit formarea de curenţi de aer în timpul lucrului;

— în timpul operaţiunilor de însămînţare se evită pe cît posibil conversaţia şi orice mişcare de prisos în jurul operatorului;

— instrumentul cu care se execută însămînţarea nu trebuie să fie atins de nici un fel de obiect nesteril (mînă, halat, masă de lucru etc.);

— însămînţările se vor executa cît mai repede, cu scopul de a reduce la minim contactul materialului de însămînţat cu atmosfera ambiantă;

— în timpul cît recipientele sau tuburile de cultură, sterile sau însămînţate, sînt deschise, vor fi ţinute în

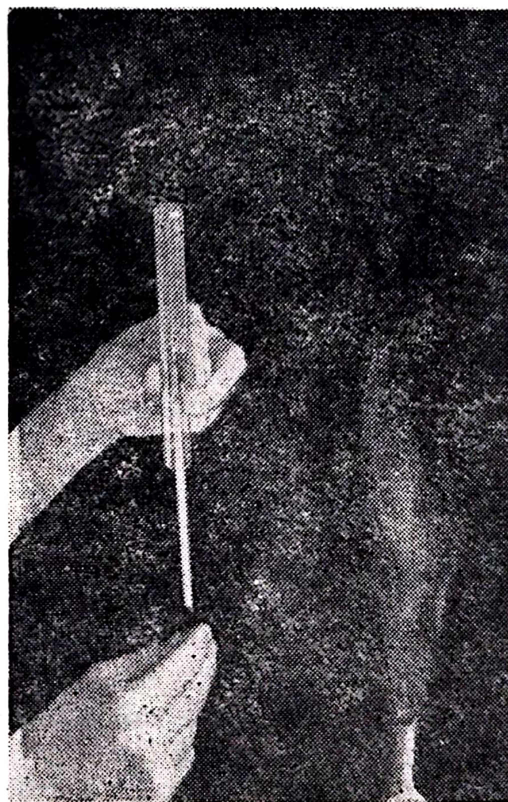


Fig. 19 — Însămînţarea în agar prin înţepare

poziţie înclinată, cît mai aproape de flacără, pentru a evita contaminarea cu germeni sau spori din atmosferă;

— imediat după însămînţare se face notarea tuburilor cu creioane dermatografe, creioane speciale sau cerneală de scris pe sticlă, fără a se omite data însămînţării.

Mediile de cultură folosite pentru izolarea diferitelor tipuri de bacterii

Pentru a pune un diagnostic bacteriologic corect, sigur şi prompt, folosirea unor medii de cultivare corespunzătoare este de o importanţă hotărîtoare. Cunoscîndu-se însuşirile germenilor căutaţi, condiţiile lor optime de dezvoltare, bacteriologul trebuie să folosească mediile cele mai eficiente şi indicate de izolare, în funcţie de specia microorganismului în cauză.

Un mediu de cultură trebuie să asigure substratul nutritiv pentru creşterea şi multiplicarea microbilor, să aibă un pH care să permită desfăşurarea normală a proceselor metabolice microbiene (în general 7,2—7,4), să asigure condiţiile de aerobioză sau anaerobioză, să fie păstrate în recipiente care să împiedice contaminarea cu alţi microbi şi să fie uşor de manevrat. În general, microbii patogeni se dezvoltă optim la temperatura corpului speciei de la care sînt izolaţi. Sînt însă şi specii microbiene care preferă temperaturi mai joase (leptospirele se multiplică la 28—30°C).

Mediile de cultură se pot împărţi în două categorii: — medii uzuale (obişnuite), pe care se dezvoltă majoritatea germenilor patogeni. Ele pot fi: pentru bacterii aerobe; pentru bacterii anaerobe; — medii speciale, destinate izolării, cultivării şi cercetării însuşirilor biologice ale anumitor specii de germeni. Ele pot fi: de izolare, de îmbogăţire, selective, diferenţiale.

Mediile speciale de izolare favorizează dezvoltarea anumitor germeni, care nu se pot cultiva de la început pe mediile obişnuite, ei necesitînd anumite condiţii speciale sau anumiţi „factori de plecare". Astfel sînt mediile cu ser, cu sînge (pentru *Pasteurelle, Corynebacterium),* cu glicerină, cu cartof, cu ou (pentru micobacterii).

Mediile de îmbogăţire sînt folosite pentru cazurile în care în produsul patologic de examinat se bănuieşte o cantitate mică de germeni patogeni şi un număr mare de germeni din flora de asociaţie. Astfel de medii sînt mediul Kaufmann—Müller (pentru enterobacteriaceae), mediul Chapman (pentru stafilococi patogeni), mediul Korthoff (pentru leptospire).

Mediile selective favorizează, prin compoziţia lor chimică, dezvoltarea anumitor germeni. Astfel sînt mediul Wilson—Blair şi Drigalski (pentru salmonele), mediul Istrati—Meitert (pentru *Escherichia, Shigella, Salmonella),* mediile Löwenstein—Jensen, Sauton, Youmans (pentru micobacterii) mediile Czapek, Sabouraud (pentru ciuperci).

Mediile diferenţiale permit creşterea diferenţiată a unor specii microbiene sau pun în evidenţă anumite particularităţi metabolice cu semnificaţie diagnostică. Ele evidenţiază anumite procese biochimice caracte-

ristice metabolismului anumitor specii de bacterii, permiţînd în acest fel identificarea lor (fenomene proteolitice, zaharolitice, oxidoreductoare etc.). Includerea în componenţa acestor medii a unor substanţe indicatoare sau revelatoare este menită să facă vizibil procesul respectiv. Astfel pot fi citate mediul Fergussen (pentru evidenţierea ureazei) mediul cu acetat de plumb (pentru detectarea formării de hidrogen sulfurat), mediul Drigalski (pentru diferenţierea speciilor lactozo-pozitive) etc.

Pentru speciile de germeni anaerobi se folosesc de asemenea medii speciale, cum ar fi bulionul de ficat, geloza Veillon, geloza cu sînge Zeissler, iar pentru determinarea mobilităţii unor germeni mediul semisolid Tittsler—Sandholzer.

După starea lor fizică mediile se pot împărţi în: solide, semisolide, lichide.

După compoziţie pot fi: medii simple şi complexe.

Există şi medii „sintetice“ bazate pe componente cunoscute din punctul de vedere al structurii lor chimice. În comparaţie cu bulionul, agarul sau alte medii ale căror componente nu sînt identificate chimic în totalitate, mediile sintetice au avantajul că permit anumite determinări capabile să ofere relaţii asupra metabolismului bacterian (prin dozarea înainte şi după cultivare a diferitelor componente se poate cunoaşte ce anume a fost consumat în cursul multiplicării şi în ce cantitate).

Dintre cele mai frecvent folosite medii de cultură sînt date, în cele ce urmează, cîteva reţete şi moduri de preparare.

Apa peptonată este unul din cele mai simple medii de cultură, dar care are largi utilizări, în special cînd i se adaugă zaharuri, în vederea determinării spectrului zaharolitic al diferitelor specii de bacterii. Se prepară din:

— apă distilată	100,0 ml
— peptonă	1,0 g
— NaCl	0,5 g

Se ajustează pH-ul la 7,2—7,4, se încălzeşte 15 minute la 115°C pentru precipitare, se filtrează prin hîrtie de filtru şi se sterilizează din nou la autoclav.

Cînd se adaugă zaharurile, acestea se pun în proporţie de 1‰ în balonaşe separate, se adaugă albastru de bromtimol (12 ml la 1 l de mediu) ca indicator şi se sterilizează prin tindalizare 30 de minute, 3 zile consecutiv. Soluţia de albastru de bromtimol folosită în acest scop se prepară din: 1 g albastru de bromtimol + 25 ml NaOH n/10 + 475 ml apă distilată.

Bulionul de carne se prepară mai ales din carne de bovine şi cabaline, mai rar din cea de pasăre. Muşchii se curăţă de aponevroze, tendoane, fascii şi grăsime, se taie bucăţi mici, sau se toacă la maşina de tocat carne. La 500 g tocătură, se adaugă 1000 ml apă de robinet, se ţine 24 de ore la rece, pentru macerare, apoi se fierbe 30 minute, se decantează şi se stoarce, iar lichidul obţinut se filtrează prin mai multe straturi de tifon şi se completează cu apă la volumul iniţial. Se încălzeşte la 80—90°C şi se adaugă peptonă 10 g şi NaCl 5 g la 1000 ml lichid.

Se ajustează pH-ul cu o soluţie de NaOH n/1 (la 7,2—7,6) prin metoda colorimetrică. Se încălzeşte la autoclav la 115°C timp de 15 minute. Încălzirea în prezenţa NaOH produce o precipitare abundentă, ceea ce impune o filtrare prin hîrtie de filtru. Apoi se face repartizarea în tuburi, în

cantitate de cca 5 ml, în sticle sau baloane, care se astupă cu dopuri de vată şi se sterilizează 30 minute la autoclav la 115°C.

Pentru repartizare se pot folosi pipete de 25—50 ml, dar cel mai practic este să se folosescă dispozitive speciale constînd din vase cu tubulură inferioară sau pîlnii suspendate, prevăzute cu un tub de cauciuc şi clemă. În unele laboratoare există dispozitive automatizate care asigură un debit constant, reglabil.

Bulionul astfel preparat are un aspect asemănător cu untdelemnul şi trebuie să fie perfect limpede.

Păstrarea lui se poate face vreme îndelungată în vase bine închise, în încăperi reci şi la adăpost de lumină.

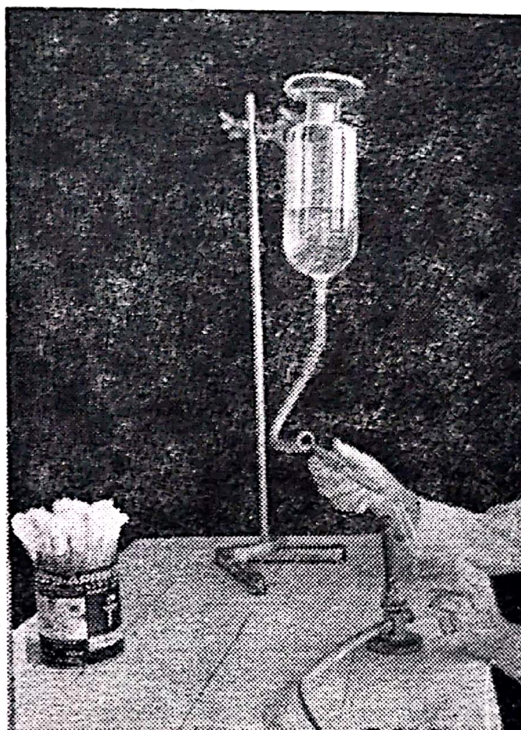


Fig. 20 — Distribuirea mediilor de cultură

În funcţie de speciile bacteriene care urmează a fi cultivate, pot fi preparate şi alte variante de bulion, cum ar fi bulionul triptic sau bulionul Martin. Ele diferă de bulionul obişnuit prin aceea că peptona este înlocuită cu alte preparate, asemănătoare ca structură chimică. Astfel, în cazul bulionului triptic se foloseşte un extract de carne obţinut prin digestia acesteia sub acţiunea tripsinei iar în cazul bulionului Martin, se foloseşte un extract de stomac de porc, obţinut prin acţiunea acidului clorhidric.

La ora actuală, este din ce în ce mai răspîndită folosirea extractelor de carne care sînt livrate în stare deshidratată, purificată şi standardizată, ceea ce asigură obţinerea unor medii de o calitate superioară (extractele Difco, Merck, Oxoid etc.).

Agarul nutritiv (geloza) este un mediu solid obţinut prin adăugarea la bulionul de carne a agarului (fibre sau pulvis). Acesta nu are nici un rol nutritiv, dar determină solidificarea mediului.

La 1 litru de bulion, se calculează 30 g agar fibre sau 25 g agar pulvis, care se topeşte apoi prin încălzire la 115°C, timp de 15 minute la autoclav. Se filtrează prin vată, în autoclavul cu capacul deschis (pentru a evita solidificarea pe parcursul filtrării).

Se repartizează în eprubete sau alte recipiente unde urmează a fi păstrat. Se astupă cu dopuri de vată, se sterilizează 20 de minute la 120°C după care eprubetele se pun în poziţie înclinată pentru solidificare.

Păstrarea se poate face în flacoane închise etanş pentru a evita pierderea apei, dar în general este bine să nu se prepare şarje prea mari pentru a dispune de mediu cît mai proaspăt.

Agarul moale este un mediu semisolid, folosit pentru cultivarea şi mai ales pentru conservarea tulpinilor bacteriene.

Se prepară la fel ca agarul înclinat, cantitatea de agar fiind însă mai redusă (2—5 g agar la 1000 ml bulion).

Bulionul cu ficat se folosește pentru cultivarea bacteriilor anaerobe și se bazează pe faptul că țesuturile animale cum sînt ficatul, rinichiul, mușchiul, prin conținutul lor în cistină, au capacitatea de a fixa oxigenul din mediu, creînd astfel condiții favorabile dezvoltării bacteriilor anaerobe.

Pentru preparare, ficatul proaspăt (preferabil de bovine) se fierbe și se taie în fragmente de formă paralelipipedică, cu înălțimea de 3—4 cm și lățimea de 1—2 cm. Aceste porțiuni de ficat se introduc în tuburi cu bulion simplu, se adaugă glucoză în proporție de 1% (la fiecare tub se pun 5—6 picături dintr-o soluție de glucoză 20%) și se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

Dacă mediul se folosește după un oarecare timp de la preparare, se face regenerarea lui prin fierbere timp de 10 minute în baie de apă (pentru eliminarea oxigenului dizolvat în mediu).

Bulionul cu ficat și carne (VF) se folosește în același scop ca și precedentul. Pentru preparare, la 1000 ml apă distilată se adaugă 250 g carne de vițel și 250 g ficat de vițel, tocate mărunt. Fierberea timp de 20 minute este urmată de filtrarea prin tifon. Amestecul de ficat și carne rămas pe tifon se spală de 4—5 ori cu apă distilată și se usucă. Sub această formă se adaugă la tuburile cu bulion de carne obișnuit, în cantitate de 1—3 g/tub.

Lichidul rezultat din filtrare se completează cu apă la volumul inițial de 1000 ml, se adaugă 5 g peptonă și 5 g NaCl. Se încălzește pînă la dizolvarea acestora și se ajustează pH-ul la 8. Se autoclavează 20 minute la 120°C, după care se adaugă glucoză 2%. Se filtrează prin hîrtie de filtru și se repartizează cîte 6 ml în tuburile în care s-au pus în prealabil 3 g din amestecul de carne și ficat. La suprafață se poate adăuga un strat de oleu de parafină, de aproximativ 1 mm grosime. Mediul se sterilizează timp de 15 minute la 115°C sau prin tindalizare la 100°C timp de 30 minute, 3 zile consecutiv (cu capacul autoclavului nefixat).

Geloza Veillon servește mai ales pentru cultivarea germenilor anaerobi. Se prepară din:

— bulion de carne	1 000 ml
— agar fibre	8—10 g
— glucoză	5—10 g
— azotat de potasiu	1— 2 g

Se dizolvă mai întîi glucoza și azotatul de potasiu în bulion, se adaugă agarul tăiat mărunt, se încălzește la autoclav, se filtrează prin vată și se repartizează în tuburi înguste Weinberg (8—10 mm diametru și 20—25 cm înălțime) astfel ca mediul să ocupe mai mult de jumătate din înălțimea tubului. Se sterilizează la 100°C timp de 15 minute și se solidifică în poziție verticală.

Adăugarea azotatului de potasiu se face cu scopul de a preîntîmpina fragmentarea mediului prin gazele produse în cursul metabolismului bacterian. Bioxidul de carbon și hidrogenul care rezultă în cursul dezvoltării germenilor sînt transformate în prezența azotatului de potasiu în carbonat de potasiu și apă.

Bulionul și agarul cu ser se folosesc pentru izolarea primară a unor bacterii (pasteurele, corynebacterii, unii streptococi etc.).

Se prepară din medii uzuale (bulion, agar) la care se adaugă ser normal nefenicat în proporție de 1/10 (de obicei ser de cal). Recoltarea

sîngelui pentru obținerea serului se face în recipiente sterile prevăzute cu baghete de sticlă așezate încrucișat. După exprimarea serului, se decantează în flacoane sterile. Se face controlul sterilității lui prin însămînțări pe medii de cultură și dacă nu este steril se filtrează imediat prin filtrul Seitz EKS.

Pentru prepararea agarului cu ser, mediul se topește în prealabil, se lasă să se răcească la 45°C, se adaugă serul, se omogenizează și se lasă să se solidifice în poziția dorită. După adăugarea serului, mediile se controlează din punct de vedere al sterilității, ținîndu-se la termostat 24 de ore.

Mediile glicerinate se folosesc pentru cultivarea bacililor tuberculozei, morvei, brucelelor, cele mai uzuale fiind bulionul glicerinat, agarul glicerinat și cartoful glicerinat.

Bulionul și agarul glicerinat se pregătesc prin adăugarea de glicerină 1% la mediile obișnuite. Sterilizarea se face la 110°C timp de 20 minute.

Pentru pregătirea cartofului glicerinat se taie din cartofi de bună calitate curățați, bucăți cilindrice (cu ajutorul unor preducele speciale avînd diametrul ceva mai mic decît al tubului de cultură). Cilindrii respectivi se taie oblic pe diagonală, rezultînd două bucăți identice care se spală în apă și se țin 3 ore într-un vas cu 1% carbonat de sodiu, pentru neutralizare (au o reacție ușor acidă). Fiecare felie se introduce apoi în cîte un tub Roux, prevăzut cu o gîtuitură la nivelul căreia felia respectivă se oprește. Apoi se toarnă în tuburi bulionul glicerinat 5%, pînă la nivelul gîtuiturii în așa fel ca partea inferioară a cartofului să fie umectată în permanență cu bulionul glicerinat. Sterilizarea se face la 110°C timp de 20 minute.

Mediul Löwenstein-Jensen este un mediu pe bază de ou, cel mai larg folosit pentru cultivarea micobacteriilor. Se prepară inițial o soluție salină compusă din:

— fosfat monopotasic	2,4 g
— sulfat de magneziu	0,24 g
— citrat de magneziu	0,6 g
— asparagină	3,6 g
— glicerină neutră	12,0 ml
— apă distilată	600,0 ml

După dizolvarea ingredientelor se sterilizează la autoclav.

Ouăle care urmează să fie folosite pentru prepararea mediului trebuie să fie proaspete, curate și relativ uniforme. Un număr de 22—26 ouă se spală întîi cu apă și săpun, cu ajutorul unei perii, se clătesc abundent cu apă și apoi se șterg cu un prosop curat și se pun timp de 30 minute în alcool 70° (nu sanitar) după care se pun într-un recipient curat. La flacără, de preferință în boxa sterilă, ouăle se sparg pe rînd cu ajutorul unei pense flambate și conținutul se scurge într-un balon rotund de 1 l, cu fund plat, sterilizat prin autoclavare și care conține perle de sticlă (pentru ușurarea scurgerii conținutului după spargerea oului la un capăt, se face un orificiu și la celălalt). După spargerea tuturor ouălor, conținutul acestora se omogenizează temeinic prin agitare și apoi se filtrează prin mai multe straturi de tifon sterilizat în prealabil, într-o pîlnie de dimensiuni corespunzătoare. Pentru facilitarea filtrării este bine ca pîlnia să fie montată la un balon Kitasato, adaptat la o trompă de vid. Se adaugă apoi 20 ml soluție 2% de verde de malahit și soluția salină

(rece) omogenizîndu-se. Amestecul are o culoare verde-deschis. Se repartizează amestecul în eprubete sterile, la flacără, cîte 5—6 ml, se înclină şi se coagulează la etuvă, la 85°C, 3 zile consecutiv, cîte 45 de minute. Este preferabilă coagularea în mediu umed (în dispozitive speciale care permit înclinarea tuburilor la nivelul dorit şi formarea de căldură umedă de vapori la nivel constant).

Tot în cultivarea micobacteriilor se mai pot folosi mediile descrise mai departe.

Mediul solid cu plasmă umană (original) a fost folosit cu rezultate foarte bune în obţinerea unor culturi abundente, chiar şi în cazul lui *M. bovis*, care se cunoaşte că se dezvoltă disgonic. Mediul se prepară dintr-un amestec salin compus din:

— KH_2PO_4	2,5 g
— K_2HPO_4	2,5 g
— $MgSO_4$	1,0 g
— Citrat de sodiu	2,5 g
— Asparagină	5,0 g
— Glicerină neutră	40,0 ml
— $CuSO_4$ sol. 0,001%	1,0 ml
— $MnSO_4$ sol. 0,001%	1,0 ml
— Apă distilată	960,0 ml

Dizolvarea realizată prin fierbere la baia de apă este urmată de adăugarea a 25 g agar pulvis (Difco, BDH). După topire, se face o filtrare prin vată şi sterilizarea la autoclav (121°C timp de 15 minute). Lichidului răcit apoi la temperatura de 55°C i se adaugă 100 ml plasmă umană, încălzită şi ea la 45—50°C şi 100 000 U.I. penicilină. Omogenizarea temeinică este urmată de repartizarea în tuburi sterile, în cantitate de 5—6 ml şi înclinarea pentru solidificare. Se obţine un mediu solid, transparent, de culoare gălbuie, foarte asemănător cu agarul obişnuit.

Mediul Sauton este un mediu glicerinat, sintetic, lichid, compus din:

— asparagină	4,0 g
— acid citric	2,0 g
— fosfat bipotasic	0,5 g
— sulfat de magneziu	0,5 g
— citrat de fier amoniacal	0,005 g
— glicerină	60,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Asparagina şi sărurile se dizolvă într-o parte din apa încălzită la 70°C, după care se adaugă glicerina şi restul de apă. Se ajustează pH-ul la 7,2, se repartizează în recipiente şi se sterilizează.

Mediul Youmans se foloseşte pentru cultivarea micobacteriilor şi are următoarea compoziţie:

— asparagină	5,0 g
— fosfat monopotasic	5,0 g
— sulfat de potasiu	0,5 g
— citrat de magneziu	1,5 g
— glicerină	20,0 g
— apă distilată ad	1 000,0 ml

Asparagina şi sărurile se dizolvă într-o parte din apa încălzită la 70°C, după care se adaugă glicerina şi se ajustează pH-ul la 7,0—7,2.

Agarul 7H-10 Middlebrook se folosește pentru cultivarea micobacteriilor și în special pentru obținerea maselor bacteriene destinate reacțiilor serologice de identificare a acestora.

— Mediul de bază:

— K_2PO_4	1,5 g	
— Na_2HPO_4 (anh.)	1,5 g	
— citrat trisodic. $2H_2O$	0,4 g	(10% : 4 ml)
— $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05 g	(5% : 1,0 ml)
— $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,005 g	(0,5% : 1,0 ml)
— $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,001 g	(0,05% : 2,0 ml)
— $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001 g	(0,05% : 2,0 ml)
— apă distilată ad	1000,0 ml	

Se autoclavează la 120° timp de 10 minute.
La 1 l mediu de bază se adaugă:

— L-glutamat de sodiu 20%	2,5 ml	(0,5 g)
— sulfat de amoniu 20%	2,5 ml	(0,5 g)
— glicerină	5,0 ml	(6,25 g)
— citrat feroamoniacal 1%	4,0 ml	(0,04 g)
— piridoxină HCl 100 mcg/ml	10,0 ml	(0,001 g)
— biotină 100 mcg/ml	5,0 ml	(0,0005 g)
— verde de malahit 1 mcg/ml	1,0 ml	(0,001 g)

Se ajustează pH-ul la 6,8. Se repartizează cîte 200 ml în 5 flacoane Erlenmayer de 500 ml și fiecăruia i se adaugă 1,5% (3,0 g) agar pulvis. Se autoclavează la 120°C timp de 10 minute (nu mai mult) se răcește la 50—60°C și se adaugă fiecărui flacon cu 200 ml mediu:

— glucoză soluție 50%	0,8 ml	(0,2%)
— catalază tehnică 1%	0,4 ml	(0,2 mg%)
— complex acid oleic-albumină	20,0 ml	

Dacă se dispune, se poate înlocui cu DIFCO Enrichment OADC în aceeași cantitate. Se amestecă prin rotație moderată, pentru a se evita formarea bulelor de gaz și se repartizează în eprubete sau plăci Petri.

Mediul Korthoff este folosit pentru cultivarea leptospirelor. El conține:

— peptonă Witte	0,4 g
— Cl_2Ca	0,700 g
— Na_2HCO_3	0,010 g
— KCl	0,020 g
— KH_2PO_4	0,090 g
— Na_2HPO_4	0,480 g
— apă distilată	500,0 ml

După dizolvarea ingredientelor, soluția se sterilizează la 100°C timp de 30 minute. Se lasă să se răcească și se filtrează prin hîrtie de filtru. Se repartizează în baloane și se sterilizează din nou la 115°C timp de 30 minute, după care se adaugă ser de iepure steril în proporție de 5—10%. Acesta trebuie să fie în prealabil inactivat timp de 30 minute la 56°C. În final pH-ul trebuie să fie de 7,2—7,4. Se controlează sterilitatea prin incubație timp de 48 de ore la 37°C. Se vor folosi numai mediile perfect limpezi.

Mediul Uhlenhuth se folosește pentru cultivarea leptospirelor. În acest scop se fierbe apă de fîntînă pînă ce volumul ei se reduce la jumă-

tate, se ajustează pH-ul la 7,2—7,4. Se repartizează apoi în eprubete mici (10/120 mm) sau alte recipiente, se sterilizează 20 minute la 120°C şi se adaugă ser de iepure în proporţie de 5—10% inactivat în prealabil la 56°C timp de 30 minute.

Mediul Terskih se foloseşte tot pentru cultivarea leptospirelor. Constă din:

— apă distilată	90 ml
— soluţie tampon Sörensen pH = 7,2	10 ml

Se sterilizează la autoclav timp de 30 minute la 120°C, după care se adaugă 7—10 ml ser de iepure inactivat şi se distribuie în tuburi sterile.

Soluţia tampon Sörensen este formată din: soluţia A (11,876 g fosfat disodic anhidru în 1000 ml apă) şi soluţia B (9,078 g fosfat monopotasic anhidru în 1000 ml apă). Amestecarea acestora se face în proporţie de 8 ml soluţie A şi 2 ml soluţie B.

Mediile hiperclorurate au o acţiune selectivă, permiţînd dezvoltarea stafilococilor şi unor streptococi (enterococi), inhibînd în acelaşi timp dezvoltarea celorlalte specii bacteriene. Concentraţia NaCl în aceste medii este de 6,5%.

Agarul cu sulfatiazol. Adăugarea de sulfatiazol la agarul obişnuit în proporţie de 0,002% are capacitatea de a inhiba mobilitatea speciei *Proteus vulgaris*, permiţînd în acest fel izolarea germenilor patogeni din culturi sau materiale patologice contaminate cu Proteus.

Mediile cu antibiotice. Se folosesc în scopul izolării unor germeni din grupa micoplasmelor, a ciupercilor din materialele contaminate cu alte bacterii şi a mutantelor antibiorezistente ale bacteriilor. Adăugarea antibioticelor se face în proporţii variabile în funcţie de natura acestora.

Mediile cu substanţe colorante. *Cristalul violet* adăugat în proporţie de 1/500 000 permite dezvoltarea streptococilor, dar are o acţiune inhibantă asupra altor specii bacteriene.

Agarul cu sînge defibrinat 1/10 şi verde briliant 1/40 000 se foloseşte pentru izolarea germenilor din genul *Campylobacter (Vibrio)*. El constă în următoarele:

— bulion de carne	1 000,0 ml
— agar fibre	25,0 g
— peptonă Bacto	10,0 g
— NaCl	5,0 g
— verde briliant 1/100	2,5 ml

Se ajustează pH-ul la 7,4—7,6 şi în momentul turnării în plăci se adaugă sîngele.

Mediul Kaufmann-Müller este un mediu de îmbogăţire, folosit mai ales pentru izolarea germenilor din genul *Salmonella* în cazul cînd în materialul patologic (fecale) ei se găsesc în număr redus. El se compune din:

— bulion	90,0 ml
— carbonat de calciu	5,0 g
— bilă de bou sterilizată	5,0 ml

Se sterilizează amestecul timp de 30 minute la 120°C, se lasă să se răcească şi se adaugă în condiţii de sterilitate:

— soluţie apoasă de verde briliant 1‰	1,0 ml
— soluţie Lugol	2,0 ml
— soluţie de tiosulfat de sodiu 50%	2,0 ml

Se repartizează în tuburi sterile cîte 10—15 ml și se incubează la 37°C timp de 48 de ore pentru controlul sterilității.

Mediul cu selenit de sodiu (Leifson) are aceleași indicații ca și precedentul și se prepară din:

— biselenit de sodiu anhidru	0,6 g
— fosfat disodic (12 · H_2O)	0,5 g
— lactoză	0,4 g
— peptonă	0,4 g
— apă distilată	100,0 ml

Se ajustează pH-ul la 7, se sterilizează prin fierbere 5 minute și se repartizează în tuburi sterile.

Mediul Chapman lichid este un mediu de îmbogățire hiperclorurat care permite dezvoltarea stafilococilor patogeni din diferite produse patologice. Constă din:

— extract de carne	4,0 g
— peptonă Witte	10,0 g
— NaCl	150,0 g
— lactoză	15,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Soluția de lactoză se prepară separat, în 100—150 ml apă distilată. Celelalte substanțe se dizolvă la cald în restul de apă distilată, se corectează pH-ul la 7,6. Se autoclavează 30 minute la 120°C. Se filtrează prin hîrtie de filtru, se adaugă soluția de glucoză și se sterilizează din nou prin autoclavare la 110°C timp de 20 minute.

Mediul Chapman solid servește la diferențierea stafilococilor patogeni de cei saprofiți și în același timp, prin conținutul de clorură de sodiu are proprietăți selective pentru stafilococi față de alte specii bacteriene. Conține:

— extract de carne	8,0 g
— peptonă	9,0 g
— clorură de sodiu	75—100 g
— manitol	10—100 g
— agar fibre	15—30 g
— roșu fenol	0,025—0,25 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă extractul de carne, peptona, clorura de sodiu, ajustîndu-se pH-ul la 7,6 și se autoclavează 20 minute la 110°C. Se topește și se adaugă soluția de manită și roșu de fenol. Soluția de roșu fenol se prepară din 0,1 g roșu fenol + 5,7 ml NaOH n/20 + 35 ml apă distilată. Manita se prepară prin dizolvarea 1/10 în apă distilată.

Mediul are o culoare roșie. Stafilococii, care fermentează manitolul, determină virarea culorii mediului spre galben, în timp ce cei saprofiți nu modifică culoarea mediului.

Mediul Istrate-Meitert este un mediu selectiv, folosit pentru diferențierea coloniilor de *Salmonella, E.coli* și *Proteus*. Este format din:

— agar nutritiv 2%	100,0 ml
— bilă de bou uscată la 105°C	0,3 g
— lactoză	1,5 g
— citrat de sodiu crist.	0,8 g

— tiosulfat de sodiu crist.	0,95	g
— citrat de fier	0,2	g
— soluţie de albastru de bromtimol 1/500	4,0	ml

Se ajustează pH-ul la 7,3—7,4 cu NaOH 10%. Mediul se fierbe 15 minute în baia de apă, se lasă să se răcească la 55°C şi se toarnă în plăci Petri. El are o culoare verde şi trebuie folosit în decurs de maximum 48 de ore de la preparare. Pe acest mediu care, neînsămînţat, are culoarea verde, coloniile de *Salmonella* apar albastre-verzui, cele de *E. coli* apar galbene şi cele de *Proteus* albastre-verzui, cu centrul mai opac, neinvadante.

Mediul Gassner se foloseşte în acelaşi scop ca şi precedentul. Se prepară din:

— agar nutritiv	2 000,0	ml
— soluţie de Metachromgelb 2%	125,0	ml
— soluţie Wasserblau 1%	175,0	ml
— lactoză	10,0	g

Se topeşte agarul, se prepară soluţia de Metachromgelb care se filtrează şi se fierbe 2 minute, iar separat se prepară soluţia Wasserblau, care se filtrează, apoi se adaugă lactoza şi se fierbe 10 minute. La agarul topit se adaugă mai întîi soluţia de Metachromgelb şi apoi cea de Wasserblau. Culoarea mediului este verde-albăstruie. În urma dezvoltării germenilor pe suprafaţa acestui mediu, culoarea virează spre galben în dreptul coloniilor de *Salmonella* şi în albastru intens în dreptul celor de *E. coli*.

Mediul Drigalski se foloseşte pentru diferenţierea speciilor lactozo-pozitive de cele care nu fermentează lactoza *(Salmonella)*.

La o cantitate de geloză 3% topită se adaugă 1% lactoză şi turnesol în soluţie de 10% pînă ce mediul capătă o culoare violet-ametist. Se repartizează în cutii Petri, se controlează sterilitatea prin termostatare.

Dacă se adaugă mediului şi o soluţie de cristal violet, el dobîndeşte o valoare selectivă.

Agarul Mac Conkey este un agar selectiv ce se foloseşte cu bune rezultate pentru izolarea şi cultivarea enterobacteriaceelor din diferite materiale patologice, alimente, ape etc. Prin sărurile biliare şi cristalul violet ce le conţine, inhibă germenii Gram pozitivi şi pe cei aparţinînd altor genuri decît enterobacteriaceele. Prin conţinutul de lactoză permite de asemenea diferenţierea coloniilor lactozo-pozitive şi negative. Se compune din:

— peptonă (din caseină)	17,0	g
— peptonă (din carne)	3,0	g
— lactoză	10,0	g
— bilă uscată	1,5	g
— NaCl	5,0	g
— roşu neutru	0,03	g
— cristal violet	0,001	g
— agar-agar	13,5	g
— apă distilată	1 000,0	ml

pH-ul final este 7,1. Salmonelele şi shigelele cresc sub formă de colonii incolore transparente, *E. coli*, sub formă de colonii mari roşii cu halou opac, *Klebsiella* şi *Enterobacter*, sub formă de colonii mari, de

culoare roz, mucoase, enterococii și stafilococii sub formă de colonii mici, izolate, opace.

Geloza cu sînge Zeissler se folosește pentru izolarea unor germeni care nu cresc de la început pe medii obișnuite (streptococi, corynebacterii), pentru a testa capacitatea hemolitică a unor tulpini (stafilococi, streptococi etc.) și pentru cultivarea germenilor anaerobi, cu condiția ca incubația să se realizeze în anaerobioză. Se prepară astfel:

— geloză peptonată cu pH 7,2—7,4	100,0 ml
— glucoză soluție 20% sterilă	10,0 ml
— sînge de oaie sau cal, defibrinat	20,0 ml

Se topește geloza și se răcește la 56°C, se adaugă steril cu o pipetă soluția de glucoză, apoi sîngele defibrinat, amestecîndu-se încet. Apoi se repartizează în plăci Petri cîte 8—10 ml și se așază în poziție perfect orizontală pentru a asigura o uniformitate a grosimii stratului de mediu. Dacă fundul plăcilor este neregulat, se poate folosi turnarea prealabilă a unui strat de agar de egalizare, format din:

— NaCl	8,5 g
— fosfat disodic	0,5 g
— agar fibre	16,0 g
— apă distilată ad	1 000,0 ml

Turnarea gelozei cu sînge se face peste agarul de egalizare, după solidificarea acestuia. Este recomandabil ca după ce agarul cu sînge s-a solidificat să se țină cîteva ore (2—4 ore) la termostat pentru a se elimina apa de condensație.

În cazul cultivării anaerobilor, plăcile însămînțate se incubează la anaerostat, sau mai simplu, se folosește următoarea metodă:

— după turnarea și solidificarea în plăci a agarului cu sînge se face însămînțarea, iar pe capacul plăcii se lipește cu ajutorul unor benzi de leucoplast o pungă de hîrtie conținînd următorul amestec:

— 0,2 g pirogalol
— 0,2 g carbonat de potasiu
— 0,3—0,4 g carbonat de calciu

sau:

— 0,3 g pirogalol
— 0,3 g carbonat de potasiu
— 1,4 g pămînt de infuzorii

Etanșeizarea cu parafină, plastilină sau alt mijloc permite realizarea unui spațiu închis în care, prin reacția chimică ce are loc, oxigenul este consumat, anaerobii dezvoltîndu-se foarte bine. Mai practic este ca lipirea pungii să se facă pe partea externă a capacului după care acesta se întoarce, se pune cu punga spre interiorul plăcii însămînțate și se etanșeizează cu parafină.

Mediul Tittsler-Sandholzer se folosește pentru studiul mobilității bacteriilor. Se prepară astfel:

— bulion de carne	1 000,0 ml
— peptonă	5,0 g
— geloză pulvis	5,0 g

Se ajustează pH-ul la 7,2, se sterilizează și se repartizează în tuburi în poziție verticală. Însămînțarea se face prin înțepare în centrul mediului. La bacilii mobili se observă difuzarea lor în mediu în toate direcțiile,

de la linia de însămînțare spre pereții tubului, dînd mediului un aspect opalescent. Bacilii imobili se dezvoltă exclusiv de-a lungul liniei de însămînțare. Servește de asemenea și pentru stabilirea afinităților față de oxigen, în sensul că germenii aerobi vor dovedi o dezvoltare mai intensă spre suprafața mediului, abundența scăzînd spre profunzime (aspectul de brad răsturnat), în timp ce la cei anaerobi situația este inversă.

Mediul pentru punerea în evidență a ureazei (Christensen) se folosește pentru punerea în evidență a capacității unor germeni de a descompune ureea, punînd în libertate apă, CO_2 și NH_3. Se compune din:

— peptonă Bacto	0,5 g
— NaCl	2,5 g
— KH_2PO_4	1,0 g
— glucoză	0,5 g
— apă distilată	500,0 ml

După dizolvarea ingredientelor, se fierbe și se adaugă 3 ml dintr-o soluție de roșu fenol 1/500, ca indicator. După autoclavare și răcire, se adaugă 10 g uree (dizolvată în prealabil în apă distilată și sterilizată prin filtrare prin filtru Seitz). Mediul are o culoare gălbuie.

Indicatorul din mediu, în prezența unor germeni care hidrolizează ureea, datorită amoniacului ce rezultă, virează spre roșu-violet intens (salmonelele = negativ, Proteus = pozitiv).

Mediul Fergusson se folosește pentru testarea capacității ureazice a bacteriilor. Se compune din:

— uree	2,0 g
— fosfat monopotasic	0,1 g
— fosfat bipotasic	0,1 g
— NaCl	0,5 g
— alcool 95°	1,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

Ca indicator se adaugă roșu de fenol în proporție de 0,2‰. Mediul are o culoare galbenă. Dacă tulpina microbiană însămînțată produce urează, ureea se descompune și culoarea mediului virează în violet.

Bulionul cu uree se folosește pentru punerea în evidență a ureazei. Se compune din:

— extract de drojdie	0,1 g
— KH_2PO_4	9,1 g
— Na_2HPO_4	9,5 g
— uree	20,0 g
— roșu fenol	0,01 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Mediul se sterilizează prin filtrare, pH-ul fiind în final de 6,8. Se repartizează cîte 3 ml în tuburi de reacție.

Se poate recurge și la dizolvarea ingredientelor, cu excepția ureei, în 900 ml apă distilată urmată de sterilizare. După răcire se adaugă 100 ml soluție 20% uree sterilizată prin filtrare. După omogenizare se repartizează steril cîte 3 ml în tuburi de reacție.

Însămînțarea se face abundent, din culturi pe mediu solid, pentru a obține o suspensie densă. Se incubează la baia de apă la 37°C și se interpretează rezultatul după 10 minute, 60 minute, 2 ore, 8 ore, 12 ore și 24 ore.

Reacţia pozitivă constă în colorarea mediului în roşu. Reacţia negativă este exprimată de păstrarea culorii iniţiale (galbenă) a mediului.

Mediul multitest SIM (Costin 1969) se foloseşte pentru identificarea enterobacteriaceelor, permiţînd punerea în evidenţă a indolului, hidrogenului sulfurat şi mobilităţii. Culturile folosite trebuie să fie pure. Compoziţie:

— peptonă (din caseină)	20,0 g
— peptonă (din carne)	6,0 g
— citrat feric amoniacal (III)	0,2 g
— tiosulfat de sodiu	0,2 g
— agar-agar	3,0 g
— apă distilată ad	1 000,0 ml

Se dizolvă ingredientele în apă distilată prin încălzire pînă la fierbere, se repartizează în tuburi în aşa fel încît înălţimea mediului să fie de cca 4 cm. Se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C şi se solidifică în poziţie verticală. În final pH-ul trebuie să fie de 7,3±0,1 la 37°C.

Însămînţarea prin puncţie este urmată de incubaţie timp de 18—24 ore la 37°C.

Mobilitatea este indicată de o turbiditate difuză în jurul liniei de însămînţare în timp ce lipsa mobilităţii, de creşterea strict de-a lungul liniei, fără difuziune în jur. Producţia de H_2S este exprimată de înnegrirea de-a lungul liniei de însămînţare sau în jurul acesteia. Adăugînd peste mediu reactiv Kovacs, colorarea purpurie a acestuia relevă prezenţa indolului.

Mediul Kligler este un mediu solid multitest, ce se foloseşte în diferenţierea germenilor Gram negativ pe baza capacităţii lor de a produce H_2S şi de a fermenta lactoza şi glucoza. Se prepară din:

— extract de carne	3,0 g
— extract de drojdie	3,0 g
— peptonă din cazeină	15,0 g
— peptonă din carne	5,0 g
— lactoză	10,0 g
— glucoză D	1,0 g
— citrat feroamoniacal	0,5 g
— NaCl	5,0 g
— tiosulfat de sodiu	0,5 g
— roşu fenol	0,024 g
— agar	12,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se ajustează pH-ul la 7,4 şi se repartizează cîte 4 ml în tuburi de 120/12 ml. Se sterilizează 15 minute la 115°C, se solidifică înclinat, în aşa fel încît să se obţină o coloană compactă de 1—1,5 cm şi o pantă.

Însămînţarea se face din cultura pe mediu solid — coloana prin înţepare, iar panta în suprafaţă. Incubarea se face la 37°C timp de 24 de ore. La interpretare se vor avea în vedere aspectele furnizate de coloană şi de pantă:

— coloana:
  — nemodificată: (roşie) glucoza nu a fost fermentată
  — galbenă: glucoza a fost fermentată

— cu producţie de gaz
— fără gaze
— panta:
— nemodificată (roşie): lactoza nu este fermentată
— galbenă: lactoza este fermentată

Producţia de H_2S este sugerată de apariţia unui inel negru la partea superioară a coloanei sau înnegrirea întregii coloane de mediu.

Mediul pentru punerea în evidenţă a scindării gelatinei şi producerea de H_2S. Se compune din:

— bulion de carne	1 000,0 ml
— extract de drojdie	10,0 ml
— peptonă purificată	10,0 g
— gelatină	30,0 g

După filtrare, se sterilizează şi apoi se adaugă la fiecare 100 ml cîte 1 ml $Na_2S_2O_3$ soluţie 2%, 0,05 g sulfat feroamoniacal. Se fierbe 20 de minute şi se repartizează în tuburi sterile, cîte 10 ml. Însămînţarea se face cu un ac de însămînţare fără ansă (prin înţepare).

Incubaţia timp de cîteva zile presupune urmărirea eventualei lichefieri a mediului. Citirea se face întotdeauna faţă de tub martor neînsămînţat şi după o prealabilă menţinere la frigider. În caz pozitiv, în tuburile însămînţate agarul este lichefiat.

Mediul cu subacetat de plumb se foloseşte pentru punerea în evidenţă a bacteriilor care produc H_2S. În acest scop, se topesc, prin fierbere, un număr de tuburi cu geloză simplă 2% şi se adaugă steril fiecărui tub cîte 0,1 ml dintr-o soluţie apoasă sterilă 10% de subacetat de plumb. Se amestecă prin agitare şi se lasă să se solidifice în poziţie verticală. Însămînţarea se face prin înţepare. Tulpinile care produc H_2S înnegresc mediul în zona de creştere a culturii.

Mediul pentru punerea în evidenţă a reducerii nitraţilor în nitriţi, se foloseşte pentru identificarea acelor bacterii care au enzime capabile să reducă nitraţii în nitriţi şi se compune fie din bulion la care se adaugă azotat de potasiu (NO_3K) în proporţie de 0,2% fie din următoarea compoziţie:

— peptonă	10,0 g
— NO_3K	10,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

După încălzirea mediului în scopul dizolvării substanţelor, acesta se sterilizează prin tindalizare şi se repartizează în tuburi.

Mediul însămînţat se controlează după 3—5 zile de incubare, prin adăugarea a cîte 5 picături din reactivul Griess-Ilosvay. În cazul reacţiei pozitive, după adăugarea reactivilor, mediul se colorează în roşu, iar dacă nu a avut loc reducerea, culoarea nu se modifică.

Se poate folosi şi un mediu solid avînd următoarea compoziţie:

— extract de carne	3,0 g
— peptonă	5,0 g
— azotat de potasiu	1,0 g
— agar-agar	12,0 g

Dizolvarea ingredientelor este urmată de sterilizarea la autoclav, repartizarea în tuburi şi solidificarea în poziţie înclinată. Însămînţarea în suprafaţă permite observarea producţiei de gaze prin apariţia de crăpă-

turi în mediu. La adăugarea cîtorva picături de reactiv Griess-Ilosvay, colorarea în roșu indică o reacție pozitivă.

Mediul cu citrat de sodiu Simmons se folosește pentru testarea capacității unor bacterii de a utiliza citratul ca substrat nutritiv. Se compune din:

— clorură de sodiu	5,0 g
— sulfat de magneziu	0,2 g
— fosfat de amoniu biacid	1,0 g
— citrat de sodiu crist.	2,77 g
— agar	20,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă întîi ingredientele, se încălzește amestecul pînă la topirea gelozei, se stabilește pH-ul la 7,2, se adaugă 10 ml dintr-o soluție de albastru de bromtimol 1,5%. Se filtrează, se repartizează, se sterilizează la 120°C timp de 15 minute, se repartizează și se solidifică în plăci Petri sau în tuburi (în poziție înclinată). Pe acest mediu unele bacterii nu se dezvoltă, în timp ce altele se dezvoltă bine și prin alcalinizarea lui determină modificarea culorii acestuia în albastru intens. Reacția pozitivă este dată de colorarea de la verde la albastru a mediului în timp ce o reacție negativă este indicată de rămînerea neschimbată a culorii și nedezvoltarea culturii.

Mediul cu citrat Koser se folosește în același scop ca și precedentul și constă în:

— NaCl	5,0 g
— sulfat de magneziu	0,2 g
— fosfat de amoniu	1,0 g
— fosfat bipotasic	1,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

După dizolvarea ingredientelor se ajustează pH-ul la 6,8 și se adaugă 2,0 g de acid citric. Se reajustează pH-ul la 6,8 și se repartizează în tuburi cîte 5 ml. Se sterilizează 10 minute la 115°C.

Însămînțarea se face cu ansa dintr-o suspensie în soluție salină fiziologică sterilă a unei culturi tinere pe agar sau direct din cultura pe agar. Incubarea la 37°C timp de 4 zile este urmată de interpretare.

Reacția pozitivă este dată de dezvoltarea culturii și tulburarea mediului, iar reacția negativă de aspectul limpede al acestuia.

În interpretarea rezultatelor însămînțărilor pe mediile enunțate se au în vedere o serie de însușiri morfologice, culturale, biochimice ale germenilor care s-au dezvoltat, ele coroborîndu-se eventual, cu datele de patogenitate și antigenitate.

Examenul caracterelor culturale

Dezvoltarea germenilor bacterieni pe mediile de cultură ia aspecte diferite în funcție de specia în cauză, mediul folosit și uneori condițiile de cultivare. Pentru unele specii, o serie de caractere culturale reprezintă particularități deosebit de prețioase pentru identificarea lor.

În mediile lichide, în aprecierea dezvoltării bacteriilor se au în vedere turbiditatea, depozitul și formațiunile de suprafață.

Turbiditatea poate fi pronunţată, discretă sau poate să lipsească.

Depozitul ia naştere prin depunerea la fundul tubului a germenilor care s-au dezvoltat în mediu. El poate fi discret sau abundent, granular, vîscos sau pulverulent, omogenizabil sau neomogenizabil prin agitare, aderent sau nu la fundul tubului.

Suprafaţa mediului poate oferi aspectul unei membrane de grosimi variabile, rugoasă, granulară, încreţită sau netedă, sau al unui inel de grosimi variabile la suprafaţa lichidului.

Pe mediile solide, germenii constituie, prin multiplicare, aglomerări cunoscute sub numele de colonii, vizibile cu ochiul liber sau cu lupa. În aprecierea lor, se au în vedere: dimensiunile, forma în ansamblu, profilul, suprafaţa, marginile, culoarea, opacitatea, consistenţa, emulsionabilitatea.

Sub aspectul dimensiunii, coloniile pot fi de talie variabilă, pînă la cîţiva milimetri diametru.

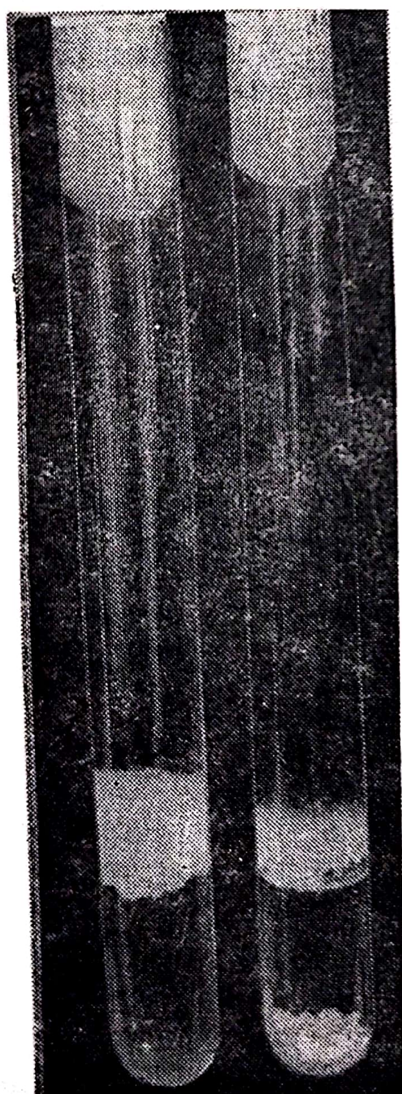


Fig. 21 — Formarea de membrană la suprafaţa mediului de cultură şi căderea la fundul eprubetei a fragmentelor de cultură *(M. avium)*

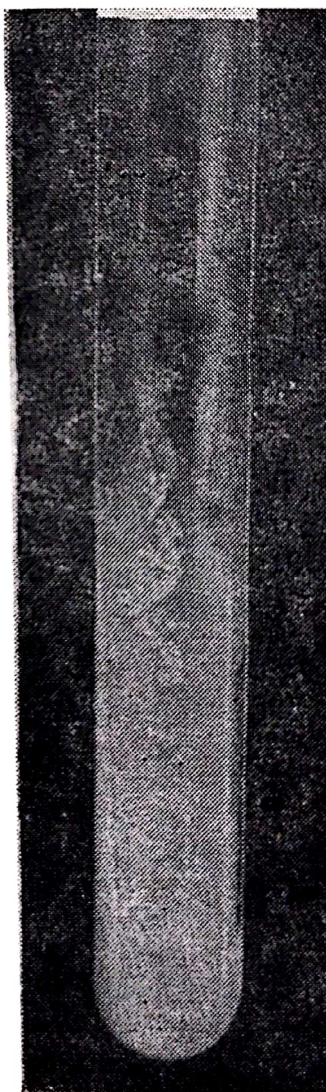


Fig. 22 — Cultură de *M. avium* pe mediu solid

Forma poate fi circulară, ovalară, radiată sau neregulată.

Profilul (în secţiune prezumtivă) poate avea un aspect plat, convex, concav, ombilicat, mamelonat sau papiliform.

Suprafaţa poate fi netedă, aspră, granulară, lucioasă sau mată.

Marginile pot fi uniforme, neregulate sau cu prelungiri.

Culoarea coloniilor este diferită în funcţie de prezenţa şi natura pigmentului pe care eventual îl conţin (alb, galben, verde, roşu, portocaliu etc.).

Sub raportul opacităţii, coloniile pot fi translucide sau opace, între ele existînd grade intermediare.

Consistenţa este şi ea variabilă: untoasă, vîscoasă, uleioasă, grunjoasă, friabilă, filantă, ea determinînd cel mai adesea şi gradul de aderenţă la suprafaţa mediului. În timp ce coloniile de consistenţă untoasă şi granulară se desprind cu uşurinţă, cele vîscoase aderă, determinînd o dificultate în desprinderea lor.

Emulsionabilitatea poate fi uşoară sau dificilă şi face ca suspensiile care se practică să fie omogene sau neuniforme. Cîteva exemple în acest sens, pot fi edificatoare.

În medii lichide:

— mediul poate fi tulbure omogen (salmonele, stafilococi);

— mediul poate fi tulbure cu un inel pe perete la limita superioară a mediului *(E. coli);*

— mediul poate fi clar, însă la fund prezintă un depozit grunjos sau nisipos (streptococi);

— mediul poate fi clar, cu un depozit floconos şi aderent la fundul tubului (bacilul antraxului);

— mediul prezintă un văl subţire la suprafaţă (vibrionul holeric);

— mediul prezintă o membrană uscată la suprafaţă *(Bacillus subtilis);*

— mediul prezintă o membrană groasă, rugoasă, plisată la suprafaţă, restul lichidului rămînînd limpede *(M. tuberculosis);*

— mediul este colorat în verde-albăstrui (b.piocianic).

Pe medii solide:

— *E. coli* dă colonii rotunde cu margini şi suprafeţe netede de 3—5 mm diametru, de culoare albă-lăptoasă, lucioase;

— Pasteurella dă, de regulă, colonii mici, abia vizibile, transparente, uneori uşor albăstrui, aderente la mediu;

— b. antraxului dă colonii cu suprafaţa aspră şi cu margini avînd prelungiri laterale, efilate, care privite cu lupa, au aspectul unor ondulaţii ale firelor de păr;

— stafilococii dau colonii rotunde, bombate, cu margini şi suprafeţe netede, unele din ele pigmentate în alb, auriu sau citrin;

— streptococii dau colonii mici bombate;

— b. tuberculozei umane produce colonii rugoase, uscate, cu margini neregulate.

Bacteriile anaerobe oferă şi ele aspecte variabile în funcţie de mediul folosit în cultivarea lor.

În cazul mediilor lichide, în general, se produce o tulburare uniformă cu sau fără producţie de gaze, vizibile sub forma unor bule fie în intimitatea lui, fie la suprafaţă.

În cazul mediilor semisolide (geloza Veillon) se pot forma două tipuri de colonii, în funcţie de difuzibilitatea germenilor în mediu, însuşire

legată de prezenţa mobilităţii. Bacteriile mobile *(Cl. tetani, Cl. chauvoei)* produc colonii pufoase de aspect sferoid, în timp ce cele imobile *(Cl. perfringens)* produc colonii de aspect lenticular, de talie variabilă. Unele din ele au mameloane centrale caracteristice, altele pot determina lichefierea parţială sau totală a mediului.

Examinarea caracterelor metabolice (biochimice) ale germenilor bacterieni

Caracterele morfo-culturale au o valoare importantă, dar nu totdeauna concludentă şi pentru a confirma datele pe care ele le furnizează este nevoie să se recurgă şi la alte mijloace suplimentare. Ele se bazează pe anumite particularităţi metabolice, cum ar fi de exemplu capacitatea de a fermenta anumite zaharuri, de a produce H_2S, indol, urează, de a reduce nitraţii, de a produce hemoliza, de a coagula plasma, de a elabora toxine etc.

Aceste caractere sînt variabile cu specia microbiană şi chiar cu tulpina şi au la bază existenţa unui echipament enzimatic diferit, care le conferă capacitatea de a acţiona asupra unor substanţe conţinute în mediu sau de a elabora, în cursul multiplicării lor, anumite substanţe noi, identificabile prin diverse reacţii chimice.

În funcţie de natura enzimelor bacteriene şi a substanţelor asupra căruia acestea activează, reacţiile biochimice pot fi diferite.

Reacţii de punere în evidenţă a capacităţii zaharolitice (fermentarea zaharurilor)

Fermentarea zaharurilor se datoreşte elaborării de către germeni a unor enzime capabile să scindeze glucidele, cu formarea de aldehide, acizi şi gaze (CO_2, H_2, CH_4). Ea se determină prin folosirea unor medii lichide (cel mai frecvent) sau solide, la care se adaugă diferite zaharuri şi un indicator care să releve transformările biochimice care survin (de obicei modificarea de pH a mediului).

Substanţele hidrocarbonate care se folosesc cel mai frecvent în acest scop sînt: glucide: dizaharide (maltoza, lactoza, zaharoza sau sucroza); trizaharide (rafinoza); pentoze (arabinoza, xiloza, ramnoza); hexoze (glucoza sau dextroza, levuloza sau fructoza, manoza, galactoza); polizaharide (inulina, amidonul, glicogenul); glicozide (salicina, esculina); polialcooli: alcooli trivalenţi (glicerina); alcooli tetravalenţi (aritrina); alcooli pentavalenţi (adonita); alcooli hexavalenţi (manita, dulcita, sorbita, inozita).

Dintre mediile lichide, cel mai frecvent folosită pentru evidenţierea însuşirilor zaharolitice este apa peptonată, în care se dizolvă, în proporţie de 1%, substanţa hidrocarbonată urmărită şi o soluţie indicatoare (albastru de bromtimol, tinctură de turnesol, roşul neutru). Mediul se repartizează de preferinţă în tuburi de reacţie tip Wassermann.

În mediul zaharat, însămînţarea tulpinii bacteriene de cercetat (de pe un mediu solid, cu ajutorul ansei bacteriologice) se soldează cu virarea

culorii mediului, în caz că s-a produs fermentarea, sau cu păstrarea culorii inițiale dacă aceasta nu s-a produs. Modificarea culorii mediului are loc în timpul incubației la 37°C, după o perioadă variabilă, în funcție de rapiditatea cu care fenomenele fermentative au loc. La unele specii, aceasta se produce după cîteva ore, în timp ce la altele este nevoie de o incubație mai îndelungată, de cîteva zile sau chiar săptămîni. În acest din urmă caz, pentru a se evita evaporarea mediului, dopurile tuburilor se parafinează sau se recurge la un procedeu de incubare în tuburi închise la flacără. Pentru aceasta, din sticla pentru pipete Pasteur, se pregătesc prin efilare la flacără pipete cu bulă, avînd ambele capete închise (mărimea bulei este de cca 1 cm iar capetele de 6—7 cm fiecare). Ele nu mai trebuie sterilizate deoarece încălzirea la flacără realizează acest deziderat.

În momentul folosirii, se rup ambele capete și se flambează, în flacără, după care se extrage din mediul zaharat o cantitate de lichid pînă la umplerea bulei. Se închid apoi capetele prin efilare (tubul fiind foarte subțire operațiunea se realizează cu ușurință). Din fiecare mediu zaharat se umplu atîtea pipete cîte tulpini se cercetează. Apoi, se rupe unul din capetele efilate și cu ajutorul unui ac de însămînțare fără ansă, flambat în prealabil și răcit, se ia o cantitate mică de cultură de pe mediul solid și se introduce prin capătul rupt al pipetei efilate, pînă în mediul conținut în bula pipetei. Apoi pipeta se închide din nou prin efilare la flacără. În mod similar, se procedează și cu celelalte pipete conținînd zaharuri diferite. Pipetele însămînțate și închise se pun apoi în stative speciale prevăzute cu orificii corespunzătoare părții efilate, în așa fel încît bulele rămîn la nivelul platformei stativului. Pentru recunoașterea tulpinilor și a zaharurilor puse în lucru, pe marginea stativului sînt notate indicativele necesare (de exemplu, pe una din laturi se indică zaharurile, iar pe latura perpendiculară pe prima, numărul tulpinii). Interpretarea este identică cu aceea din tuburi, luîndu-se ca criteriu modificarea culorii mediului.

La unele bacterii, fermentarea substanțelor hidrocarbonate este însoțită de producerea de gaze. Pentru a evidenția acest caracter, în tuburile

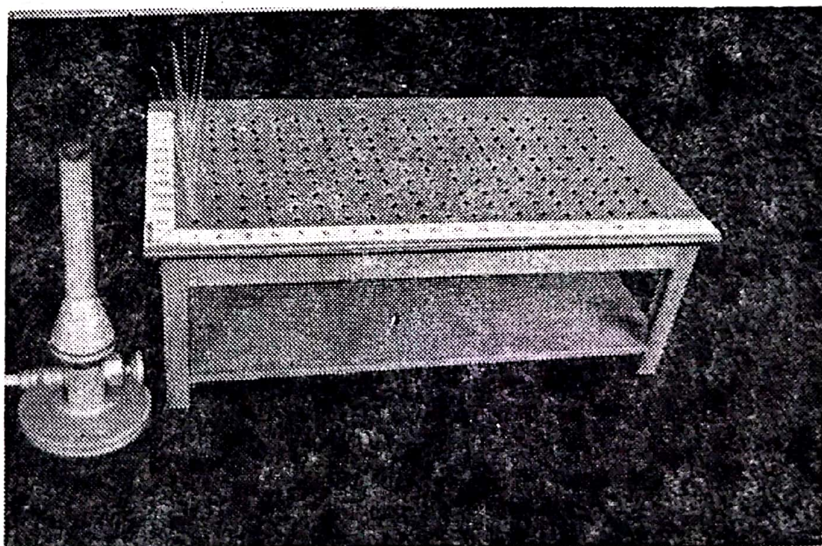


Fig. 23 — Stativ pentru pipete închise, folosite în determinarea însușirilor zaharolitice la bacterii

conținînd mediul zaharat se introduc, înainte de sterilizare, cu gura în jos, tubulețe Durham. În caz pozitiv, în acestea se acumulează gaze, care pot fi ușor observate, iar dacă sînt abundente determină chiar ridicarea spre suprafață a tubului Durham.

Mediile solide, folosite pentru a evidenția capacitatea fermentativă a bacteriilor, au înglobate în ele zahărul respectiv și un indicator, care relevă prin virarea culorii prezența procesului de fermentare (în practică se folosesc numai cîteva medii de largă circulație, pentru diferențierea unor germeni ca *E. coli, Salmonella, Klebsiella*).

Pentru a evidenția capacitatea de a hidroliza amidonul, prezentă la unele bacterii, acestea se însămînțează în plăci cu geloză conținînd 0,2% amidon solubil. După dezvoltarea culturii, suprafața mediului se acoperă cu soluție Lugol sau soluție saturată de iod (20 g iod și 100 ml alcool etilic de 50°). În cazul existenței unor colonii care au determinat hidroliza amidonului, în jurul acestora mediul rămîne necolorat, contrastînd cu restul mediului care apare de culoare albastră-violacee.

Reacții prin care se pune în evidență existența fermenților activi față de substanțele proteice și aminoacizi și existența unor produși rezultați din dezintegrarea substanțelor proteice

Testul de gelatinoliză folosește un mediu cu gelatină, preparat astfel: la 100 ml bulion obișnuit și încălzit la 55°C se adaugă, foiță cu foiță, 10—15 g gelatină și 7,5 ml dintr-un amestec rezultat din omogenizarea unui albuș de ou cu 50 ml apă distilată. Se încălzește 15 minute la 115°C. Albușul de ou, prin coagulare, antrenează toate substanțele nedizolvate din mediu, clarificîndu-l. Se fitrează prin vată, se distribuie în tuburi și se sterilizează la 110°C timp de 20 minute, după care se lasă să se solidifice în poziție verticală.

Însămînțarea se face prin înțepare, prin introducerea acului în centrul mediului, astfel ca să ajungă pînă la fundul tubului. Incubația se face la 20—22°C urmărindu-se caracterul creșterii și producerea lichefierii la diferite intervale de timp. Aspectele sînt diferite, în funcție de specie: dezvoltarea fără lichefiere, dezvoltarea în formă de perie de spălat eprubete, în formă de brad răsturnat, aspect filiform, dezvoltarea cu lichefiere, aspect de pîlnie, infundibuliform, napiform, de cupă etc.

Dacă germenul nu se dezvoltă la 20°C se poate recurge la incubația la 37°C, în acest caz fiind necesară ținerea culturilor la frigider înainte de interpretarea rezultatelor.

Testul permite diferențierea unor specii bacteriene (streptococi —, salmonella +, *E. coli* —, *Shigella* —, *Pasteurella* —) sau a prezenței altor însușiri (la stafilococi numai tulpinile patogene dețin capacitatea gelatinolitică).

Testul de lichefiere a serului coagulat se folosește pentru punerea în evidență a însușirilor proteolitice ale bacteriilor. Pentru prepararea serului coagulat, se recoltează sîngele în condiții aseptice și se distribuie în tuburi sterile. Coagularea se realizează prin încălzirea la 75°C în poziție înclinată. Rezultă un mediu de culoare albă-cenușie. Însămînțarea în suprafață se soldează, în cazul bacteriilor proteolitice, cu formarea unor depresiuni în dreptul coloniilor.

Testul cultivării bacteriilor în lapte se folosește pentru a observa modificările pe care dezvoltarea germenilor le antrenează prin multiplicare. În acest scop, laptele se degresează la separator sau prin separarea spontană a grăsimii. Se controlează pH-ul care trebuie să fie în jurul neutralității. Se repartizează în eprubete, se sterilizează prin tindalizare la 100°C cîte 30 minute sau la 110°C o singură dată timp de 20 minute (nu se sterilizează la 115°C pentru că la această temperatură cazeina se peptonizează, lactoza se caramelizează și mediul dobîndește o culoare galbenă). Pentru a putea observa modificările de pH se adaugă la mediu o soluție apoasă de tinctură de turnesol 10% sterilă, pînă cînd se obține o culoare violetă.

Însămînțarea tuburilor cu lapte poate avea ca urmare lipsa oricărei modificări, coagularea fără acidifiere, coagularea însoțită de acidifiere sau alcalinizarea laptelui, sau acidifiere, urmată de coagulare și ulterior de peptonizare.

Testul de hidroliză a cazeinei. La geloza repartizată în tuburi, sterilizată și lichefiată, se adaugă lapte steril, degresat, în cantitate de 1—2 ml la 10 ml mediu. Amestecul se repartizează în plăci Petri. Însămînțarea se face în suprafață. În cazul germenilor proteolitici, cazeina din lapte se hidrolizează și, în jurul coloniilor, mediul se clarifică.

Testul de hemoliză se folosește pentru a determina capacitatea de a hemoliza globulele roșii aparținînd unor specii variate (cal, oaie, bovine, cobai, iepure, om). Însușirea este prezentă numai la unele specii sau tulpini bacteriene și este adesea legată de patogenitatea acestora. Astfel, în cazul *E. coli,* tulpinile izolate din procese inflamatorii au această capacitate, în timp ce cele puțin sau deloc patogene nu o au. Capacitatea hemolizantă este prezentă în diferite grade și la unele tulpini de streptococi, corynebacterii, stafilococi, listerii, pasteurele *(hemolytica), Cl. perfringens,* specii din genul *Bacillus.*

Efectul hemolitic poate îmbrăca diferite aspecte în funcție de specia și tulpina în cauză. De exemplu, în cazul streptococilor, hemoliza poate fi:

— de tip alfa, care se caracterizează prin producerea în dreptul și în jurul coloniei a unei decolorări mai mult sau mai puțin întinse, în-



Fig. 24 — Hemoliză

soțită de o înverzire a mediului, datorită modificărilor chimice de oxidare ale hemoglobinei (efectul viridans); zona respectivă arată o hidroliză adevărată după o conservare de 24 ore la frigider;

— de tip beta, care se caracterizează numai prin decolorarea mediului din dreptul și din jurul coloniei și denotă liza totală a globulelor roșii din zona respectivă.

Tulpinile care, pe medii cu sînge, nu au nici un fel de acțiune asupra globulelor roșii se numesc anhemolitice sau de tip gamma și caracterizează, de regulă, germenii lipsiți de patogenitate, atît în condiții experimentale cît și naturale.

În cazul stafilococilor, hemolizinele au o activitate diferită față de globulele roșii ale diferitelor specii animale, ceea ce a determinat clasificarea lor din acest punct de vedere în 3 categorii:

a) stafilococi secretori de hemolizine alfa, active față de globulele roșii de iepure;

b) stafilococi secretori de hemolizine beta, active față de globulele roșii de oaie;

c) stafilococi secretori de hemolizine gamma, active față de globulele roșii de iepure și foarte puțin față de cele de oaie.

Hemolizinele alfa se inactivează la 60°C și se pare că se reactivează printr-o reîncălzire la 100°C, în timp ce celelalte pierd numai parțial activitatea lor la 56—60°C și se inactivează total la 100°C. Efectul hemolitic al toxinei de tip beta se accentuează la ghețar.

Pentru stabilirea capacității hemolitice, însămînțarea se face în suprafață, pe plăci Petri, pe mediul conținînd sînge defibrinat de diferite specii (bovine, ovine, iepure, cal, om) în proporție de 5‰. Citirea se face după o incubație de 24 de ore la 37°C.

Proba activității hemolizante se poate face și în mediu lichid, metodă prin care se poate realiza și titrarea capacității hemolitice. În acest scop, se amestecă în părți egale 0,5 ml cultură de 15 ore în bulion (sau bulion cu ser în cazul germenilor serofili) cu 0,5 ml suspensie 5‰ de globule roșii. Amestecul se ține 90 de minute la 37°C. Tulpinile care secretă hemolizine filtrabile, deci aparținînd tipului beta, hemolizează în acest interval globulele roșii, lichidul clarificîndu-se. Pentru titrare se realizează amestecuri cu concentrații descrescînde de cultură (0,5; 0,1; 0,01 etc.) cu un volum constant de suspensie de globule roșii.

Testul indolului. Indolul rezultă din dezintegrarea triptofanului. Pentru punerea lui în evidență se preferă culturile bacteriene în apă peptonată fără zaharuri, care oferă rezultate mai fidele. Se folosesc în acest scop diferiți reactivi (reactivul Ehrilch-Böhme, reactivul Ehrlich modificat de Kovacs, reactivul Kovacs-Hoffmann) sau hîrtii indicatoare, impregnate cu indicatori (Pingsheim, Kovacs).

Cel mai frecvent se folosește reactivul Ehrlich-Kovacs, care se adaugă cu ajutorul unei pipete, la o cantitate de 1—2 ml cultură proaspătă de 24 ore în apă peptonată, atît cît să formeze un strat de 1—2 mm la suprafața mediului. Colorarea stratului de reactiv în roșu-închis (din galben-deschis) este indiciul unei probe pozitive.

În cazul folosirii hîrtiei impregnate, aceasta se pregătește astfel:

— se taie benzi de hîrtie de filtru lungi de cca 5 cm și late de 5—7 mm;

— se îmbibă cu reactiv Kovacs proaspăt preparat sau reactiv Gillies;

— se usucă şi se păstrează în sticle brune la loc uscat şi întuneric. Benzile se fixează cu ajutorul dopului la tuburile însămînţate cu tulpina de cercetat în mediu de apă peptonată. În cazul unei reacţii pozitive, banda se colorează roşu sau roz. Dacă reacţia este negativă se execută şi reacţia după tehnica anterioară.

Acest test permite diferenţierea salmonelelor şi klebsielelor (indol-negative) de colibacili şi pasteurele (indol-pozitive). Reacţii pozitive dau şi germenii din genurile *Proteus* (rettgeri), *Providencia,* iar negative — *Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Hafnia.*

În cazul hîrtiei indicatoare, fîşii de hîrtie de filtru impregnate cu reactivul respectiv şi uscate se îmbibă cu cultura microbiană urmărindu-se modificarea culorii acesteia.

Se poate recurge şi la folosirea unor medii complexe (multitest) care permit punerea în evidenţă a indolului şi eventual a altor produse de dezasimilaţie.

Testul de evidenţiere a H_2S permite stabilirea capacităţii unor bacterii de a dezintegra aminoacizii care conţin sulf (cistina, cisteina etc.) sub acţiunea unor enzime specifice.

În acest scop se pot folosi medii cu acetat de plumb sau benzi impregnate cu aceeaşi substanţă.

În primul caz, pe medii solide cu acetat de plumb (tuburi sau plăci Petri) se face însămînţarea bacteriilor de cercetat şi se incubează la 37°C. Dacă ele produc H_2S, mediul se înnegreşte în jurul coloniilor H_2S-pozitive, din cauza sulfurii de plumb care rezultă.

În cel de al doilea caz, benzi de hîrtie de filtru de 6—8 cm lungime şi 8—10 mm lăţime, se îmbibă cu o soluţie 10% de acetat de plumb, după care se usucă, se introduc în tuburi sau flacoane şi se sterilizează la autoclav. Benzile astfel pregătite se introduc în tuburile cu mediul de cultură, pînă la înălţimea de aproximativ 1 cm deasupra suprafeţei mediului. În cursul incubaţiei, dacă germenul produce H_2S, banda se înnegreşte în porţiunea inferioară, pe o lungime mai mare sau mai mică, în funcţie de cantitatea de gaz degajată. Timpul de înnegrire este variabil de la cîteva ore la cîteva zile.



Fig. 25 — Punerea în evidenţă a H_2S cu ajutorul benzilor impregnate cu acetat de plumb

Germenii aparţinînd genurilor *Salmonella, Pasteurella, Citrobacter,* produc H_2S în timp ce alţii *(Escherichia, Shigella, Enterobacter, Klebsiella, Stafilococcus,* bacilul morvei etc.) nu produc H_2S.

Testul de hidroliză a ureei se face prin cultivarea germenilor pe anumite medii speciale (Christensen, Fergusson, bulion cu uree). În urma însămînţării, bacteriile care hidrolizează ureea determină colorarea mediului respectiv în roşu (iniţial este galben) datorită prezenţei amoniacului rezultat din metabolizarea ureei. Germeni ai genului *Proteus* hidrolizează ureea în timp ce *Shigella, Escherichia, Salmonella, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Providencia* sînt negative sau slab pozitive.

Reacţii prin care se pun în evidenţă fermenţii oxidoreductori

Testul de reducere a unor substanţe colorante se bazează pe proprietatea unor bacterii de a reduce coloranţii organici transformîndu-i în leucobaze incolore. Acestea, în prezenţa oxigenului, redobîndesc culoarea iniţială. Se folosesc în acest scop, albastru de metilen, verdele de malahit, indigo-carminul, molibdatul de amoniu.

La 5 ml de cultură de 24 ore în bulion, se adaugă o picătură din soluţia apoasă 1% de colorant, sterilă. După omogenizare se adaugă cîteva picături de oleu de parafină steril (dacă reacţia se desfăşoară în tub) sau se recurge la închiderea la flacără (dacă se folosesc fiole). După o incubaţie de 1—24 ore la termostat, se observă decolorarea mediului, care indică o reacţie pozitivă.

Testul de reducere a nitraţilor în nitriţi (denitrificare). Bacteriile de cercetat se cultivă în medii conţinînd nitrat de potasiu. După 3—5 zile de incubaţie, se adaugă cîte 5 picături din cei doi reactivi Griess-Ilosvay. În caz pozitiv, mediul se colorează în roşu. Dacă reducerea nitraţilor nu a avut loc, culoarea mediului nu se modifică.

Testul Voges-Proskauer urmăreşte punerea în evidenţă a acetil-metil-carbinolului, un metabolit rezultat prin oxidarea butilenglicolului.

Foloseşte pentru cultivarea germenilor mediul avînd următoarea compoziţie:

— peptonă Witte	5,0 g
— K_2HPO_4	5,0 g
— glucoză	5,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se ajustează pH-ul la 7,1, se filtrează, se autoclavează şi se repartizează în tuburi.

La 2 ml de cultură de 3—4 zile pe mediul Voges-Proskauer se adaugă 1 ml dintr-o soluţie alcoolică 6% de alfanaftol şi 0,4 ml KOH. Reacţia pozitivă se manifestă prin schimbarea culorii în roz-roşu în decurs de cîteva minute pînă la cîteva ore.

Testul cu roşu de metil se practică în acelaşi scop ca şi reacţia precedentă.

Se foloseşte în acest scop cultivarea germenilor pe un mediu avînd următoarea compoziţie:

— peptonă specială	7,0 g
— glucoză	5,0 g
— fosfat bipotasic	5,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se ajustează pH-ul la 6,9—7,0, se repartizează cîte 5 ml în tuburi, se sterilizează 10 minute la 121°C. Însămînţarea se face cu o picătură din cultura tînără în apa peptonată sau cu ansa dintr-o cultură tînără pe agar înclinat. Se incubează 48 ore — 4 zile la 37°C după care se adaugă 5—6 picături din reactivul roşu metil, constituit din 0,1 g roşu metil, 300 ml alcool etilic 96° şi 500 ml apă distilată. Reacţia pozitivă

constă în colorarea în roșu a amestecului, reacția slab pozitivă în roșu-portocaliu și negativă în culoarea galbenă sau slab portocalie.

În mod similar se pot folosi și alți reactivi.

— Reactivul O'Meara constă din 40,0 g hidroxid de potasiu dizolvat în 100 ml apă distilată, la care după răcire se adaugă 0,3 g creatină monohidrică și se dizolvă. Soluția poate fi păstrată la frigider (+4°C) cca 1 lună. Din acest reactiv se adaugă culturii de cercetat 5 ml, reacția pozitivă fiind dată de colorarea în roșu trandafiriu a amestecului, după agitare viguroasă și apoi lăsare în repaus. Colorarea începe de la suprafață și în decurs de cca 4 ore cuprinde tot amestecul.

— Reactivul Leifson se prepară din 1,0 g sulfat de cupru dizolvat în 40 ml amoniac concentrat (min. 25%) la care se adaugă 690 ml soluție de hidroxid de potasiu 10%. Din acest reactiv se adaugă 5 ml fiecărui tub cu cultura de cercetat. Reacția pozitivă constă în colorarea în roșu a amestecului.

— Reactivul Barrit se prepară dizolvînd 5 g alfa naftol în 100 ml ethanol. Reacția se execută adăugînd culturii proaspete de 1—2 zile 3 ml de reactiv și 1 ml KOH 40%. Reacția pozitivă este dată de colorarea în roșu.

Testul catalazei se folosește pentru punerea în evidență a existenței catalazei în culturile pe medii solide sau lichide. Se folosește apa oxigenată 3%. În cazul culturilor pe medii solide se pune o picătură de apă oxigenată pe lama de microscop și se adaugă cu o ansă bacteriologică o cantitate de cultură. Reacția pozitivă este dată de apariția unor bule de gaz (oxigen) care se degajă cu o intensitate variabilă, în funcție de cantitatea de catalază existentă în cultură.

În cazul culturilor pe medii lichide, se amestecă 5 ml din cultura în bulion triptic de 24 de ore cu 3 ml soluție de apă oxigenată. Reacția pozitivă este dată de producerea unei efervescențe cu degajare de bule de oxigen, care durează 1—2 minute. Reacția devine mai evidentă dacă, înaintea soluției de apă oxigenată, se adaugă la cultură o cantitate egală dintr-o soluție 10% de săpun.

Testul oxidazei se efectuează depunînd cîteva picături dintr-un reactiv constituit din soluție apoasă 1% de clorhidrat de tetrametil parafenilen diamină sau oxalat de dimetil parafenilen diamină, preparat, ex tempore pe un fragment de hîrtie de filtru Whatman nr. 1, avînd dimensiunile de 6 × 6 cm. Cu o ansă se ia din cultura de cercetat și se depune pe hîrtie ca la executarea unui frotiu.

Reacția pozitivă este dată de apariția unei colorații roșii-brune spre negru în dreptul culturii depuse într-un interval de 5—10 secunde, iar reacția negativă, de lipsa oricărei modificări a hîrtiei îmbibate.

Reacția se poate executa și în plăci Petri cu culturi, depunînd reactivul direct pe colonii. În cazul unor colonii oxidazo-pozitive, acestea devin succesiv roșii, brune, apoi negre.

Testul decarboxilazei — Falkov folosește un mediu de bază avînd următoarea compoziție:

— peptonă Bacto	5,0 g
— extract de drojdie de bere	3,0 g

— glucoză 1,0 g
— bromcrezol purpur (sol. alcoolică 1,6%) 1,0 ml
— apă distilată 1 000,0 ml

pH-ul = 6,7—6,8

Mediul se împarte în 4 părți egale, dintre care la 3 se adaugă aminoacizii: L-lizina dihidroclorică, L-arginina monohidroclorică, L-ornitina dihidroclorică, toate în concentrație de 1%, iar ultima servește drept martor. Se reajustează pH-ul mediilor cărora li s-au adăugat aminoacizi, se repartizează cîte 3—4 ml în tuburi de 100/10 sau 120/12 mm și se sterilizează 10 minute la 121°C. Dacă aminoacizii sînt în formă DL se folosesc în concentrație dublă — 2%.

Însămînțarea se face cu ansa, dintr-o cultură tînără pe agar înclinat și apoi se adaugă un strat de oleu de parafină steril, gros de 4—5 mm, inclusiv în tuburile martor. Incubarea la 37°C timp de 4 zile este urmată de interpretare.

Reacția pozitivă este dată de alcalinizarea mediului (datorită decarboxilării) cu schimbarea culorii sistemului de indicatori, de la galben la violet sau roșu-violet. Majoritatea reacțiilor pozitive apar în primele două zile. Reacția negativă este indicată de o culoare galbenă (pH-ul acid al mediului).

Reacții care urmăresc punerea în evidență a folosirii ca sursă de hrană a unor substraturi conținute în mediu

Testul cultivării pe medii cu citrat de sodiu. Mediul conținînd citrat de sodiu este favorabil dezvoltării numai anumitor bacterii (de exemplu *Enterobacter, Citrobacter, S. gallinarum),* în timp ce altele (de exemplu *Shigella, Escherichia coli, S. pullorum)* nu pot folosi citratul ca sursă energetică. Cele care se dezvoltă, prin alcalinizare determină și virarea culorii verzui a mediului, către albastru intens.

Teste speciale folosite pentru identificarea micobacteriilor

În practica laboratoarelor de specialitate au intrat în ultimii ani o serie de reacții pentru testarea capacității metabolice a micobacteriilor, reacții care au devenit indispensabile pentru încadrarea de specie. Cele mai importante dintre acestea sînt testul niacinei, catalazei, nitrat-reductazei, hidroliza Tween 80, determinarea spectrului amidazic. Pentru cercetări de profunzime privind stabilirea caracterelor diferitelor tulpini se poate face și stabilirea capacității zaharolitice.

Testul niacinei. Tuburilor de cultură proaspătă pe mediul Löwenstein-Jensen li se adaugă cîte 1 ml apă distilată. Se pun apoi la autoclavul cu capacul deschis timp de 20 minute, după care se scot și se lasă să se răcească. Din lichidul de extracție se pune cîte o picătură pe o placă de plastic sau preferabil porțelan, prevăzută cu godeuri. Se adaugă 1 picătură dintr-o soluție 4% de anilină în alcool etilic 90°, preparată ex tempore și o picătură de bromură de cianogen. Este indicat ca placa să se pună într-o nișă cu evacuare, pentru a evita inhalarea vaporilor toxici. Reacția pozitivă constă în apariția unei colorații galben-canar

(suşele umane), iar cea negativă în păstrarea culorii iniţiale (suşele bovine şi aviare).

După o altă tehnică, se adaugă tubului cu cultura studiată 1 ml ser fiziologic steril, se lasă 20 minute în poziţie înclinată, în aşa fel încît cultura să fie total acoperită. Se scot apoi 0,5 ml cu o pipetă şi se pun într-un tub de reacţie. Se adaugă 0,5 ml din soluţia de anilină 4% şi 0,5 ml dintr-o soluţie de 10% de bromură de cianogen (BrCN). Reacţia pozitivă este indicată de coloraţia galbenă.

Acest test se poate efectua şi după o a treia metodă. În acest scop, se iau două anse din cultura de cercetat, se pun în eprubete conţinînd 1 ml de apă distilată, se fierb timp de 1/2—1 oră, se adaugă 1 ml dintr-o soluţie 1% de KCN şi 1 ml dintr-o soluţie 5% de cloramină T, preparată ex tempore. Reacţia pozitivă este dată de aceeaşi colorare în galben a amestecului.

Întotdeauna, este necesar să se efectueze şi o probă martor folosindu-se o cultură de *M. tuberculosis* tulpina $H_{37}Rv$ pentru comparaţie (martor pozitiv).

Proba catalazei se efectuează prin punerea în contact pe lamă, a unei anse cu cultură de micobacterii, cu o picătură de apă oxigenată soluţie 30% (din soluţia de apă oxigenată de 30 de volume, existentă în comerţ se ia o parte, la care se adaugă 3 părţi de apă).

Interpretarea reacţiei se face prin aprecierea cantităţii de gaze degajată, în sensul că, cu cît există o cantitate mai mare de catalază în cultură, cu atît cantitatea de oxigen degajată este mai mare. Pozitivitatea acestei reacţii este legată de specie şi tulpină, fiind slabă la tipul uman, inconstantă la tipul bovin şi intensă la tipul aviar şi alte micobacterii atipice.

Proba nitrat-reductazei. În tuburi de reacţie corespunzătoare numeric tulpinilor cercetate, se pun întîi 0,5 ml dintr-o soluţie de $NaNO_3$ (85 mg $NaNO_3$ crist. în 100 ml apă distilată avînd pH-ul 7).

Se adaugă apoi 0,5 ml dintr-o suspensie micobacteriană omogenă, conţinînd 10 mg germeni pe ml, în soluţie tampon fosfat la pH 7,2.

Tuburile se pun la incubaţie la 37°C timp de 24 de ore. Se adaugă apoi 0,5 ml dintr-o soluţie de sulfanilamidă (1 g de sulfanilamidă în 75 ml apă distilată + 25 ml HCl) şi 0,5 ml dintr-o soluţie 0,02% de naftiletilendiamină în apă distilată. Se lasă 10 minute, după care se face citirea. Reacţia pozitivă este dată de colorarea în verde-albăstrui a amestecului. Nuanţa este variabilă în funcţie de cantitatea de nitriţi care rezultă din reducerea nitraţilor. Reacţia este pozitivă în cazul *M. tuberculosis*, negativă la *M. bovis* şi variabilă la celelalte micobacterii.

Hidroliza Tween-80. Se foloseşte o soluţie substrat formată din:

— soluţie tampon-fosfat M/15 (pH 7)	100,0 ml
— Tween—80	0,5 ml
— soluţie apoasă de roşu neutru 0,1%	2,0 ml

Se repartizează în eprubete sterile, în cantitate de 2 ml, se autoclavează, obţinîndu-se o soluţie de culoare galbenă-carmin. Soluţia se poate păstra la +4°C cca 2 săptămîni.

În tuburile conţinînd acest substrat se însămînţează tulpinile de cercetat (cîte o ansă de cultură pentru fiecare tub) fără a se omogeniza în mediu. Se incubează timp de 5 zile la 37°C, cînd se face o citire in-

termediară, iar după alte 5 zile cea definitivă. În caz pozitiv, culoarea mediului virează de la galben-carmin la roz sau chiar roșu. Tuburile nu trebuie agitate. O reacție pozitivă este concludentă dacă colorația roză sau roșie interesează numai soluția-substrat, nu și cultura.

Ca martori, se folosesc un tub cu soluție-substrat neînsămînțată (control negativ) și un tub însămînțat cu *M. kansasii* (control pozitiv).

Tipul bovin și aviar dau o reacție negativă la ambele citiri, în timp ce alte micobacterii *(kansasii, flavescens, gastri, terrae, smegmatis, phlei, marinum)* dau reacții pozitive. Tipul uman dă o reacție discretă.

Determinarea spectrului amidazic al micobacteriilor. Se dizolvă întîi amidele de cercetat în apă distilată sterilă, încălzindu-se la 60°C (la baia de apă). În mod obișnuit se folosește o serie de 10 amide (mica serie a lui Bönicke) în următoarele concentrații exprimate în mg/100 ml:

1 — acetamidă	9,68
2 — benzamidă	19,48
3 — uree	9,84
4 — izonicotinamida	20,0
5 — pyrazinamida	20,16
6 — nicotinamida	20,0
7 — salicinamida	22,46
8 — allantoina	26,0
9 — succinamida	19,0
10 — malonamida	16,72

Din soluțiile astfel preparate, se repartizează cîte 0,5 ml din fiecare, în atîtea tuburi de reacție cîte tulpini se cercetează.

În soluție tampon la pH 7,2 se realizează suspensii bacteriene omogene din tulpinile de cercetat, în concentrație de 10 mg bacterii la 1 ml soluție. Pentru o mai bună omogenizare este preferabil să se recurgă la tuburi de centrifugă sterile, a căror tară s-a făcut pentru fiecare în parte, la balanță analitică (cu 2 zecimale), în care se repartizează cîte 3—4 anse de masă bacteriană raclată de pe suprafața mediului Löwenstein-Jensen (culturi proaspete). Apoi eprubetele se recîntăresc, stabilindu-se exact greutatea germenilor. Cu baghete de sticlă de cca 5 mm diametru, sterile, se omogenizează apoi cultura pe pereții tubului, pînă se obține o pastă cît mai omogenă. Se adaugă o cantitate redusă de soluție fiziologică și se continuă omogenizarea, realizîndu-se o suspensie uniformă. Aceasta se diluează pînă la un volum de 4—5 ml și se supune centrifugării timp de 10 minute, la 3000 t/minut.

Se varsă lichidul supernatant într-un vas (care apoi se va steriliza), se omogenizează din nou cu o baghetă și se adaugă soluție fiziologică pînă la volumul inițial. Se recentrifughează, se varsă lichidul, se omogenizează și se adaugă (eventual fracționat) o cantitate de soluție tampon, variabilă în funcție de cantitatea de masă bacteriană cîntărită inițial, în așa fel încît concentrația realizată să fie de 10 mg/ml (de exemplu dacă cultura netă a cîntărit 65 mg va fi suspensionată în 6,5 ml soluție tampon fosfat).

Peste soluțiile de amide, repartizate în prealabil în eprubete, se adaugă cîte 0,5 ml suspensie bacteriană pentru fiecare tub cu amidă și se omogenizează amestecul, se pune la incubație la 37°C timp de 22 de ore, după care se efectuează reacția de testare propriu-zisă.

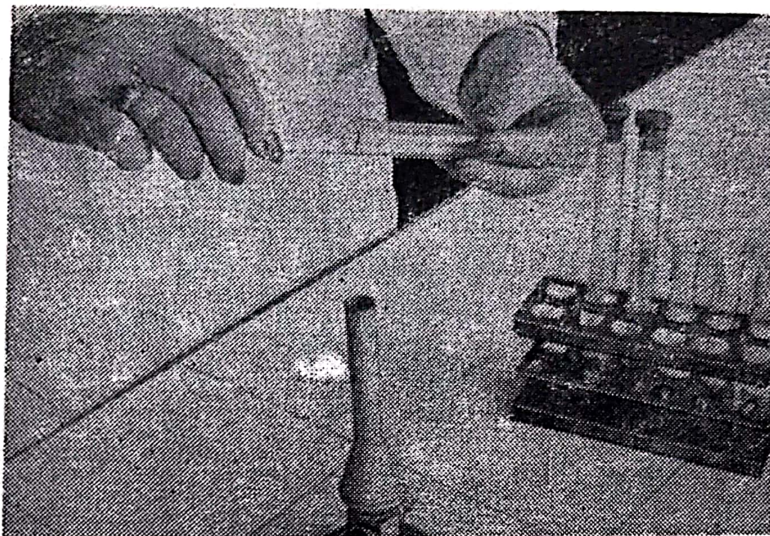


Fig. 26 — Omogenizarea culturii cu ajutorul baghetei de sticlă în eprubete de sticlă

În acest scop, se adaugă în fiecare tub cîte 1 ml reactiv fenol, o picătură dintr-o soluţie de sulfat de mangan şi 0,5 ml apă de Javelle, pregătite după indicaţiile care urmează. Amestecul are o culoare galbenă-pai. Totul se pune la etuvă la 80°C timp de 15 minute, după care se lasă să se răcească şi se face citirea. Reacţia pozitivă constă în apariţia unei coloraţii de nuanţe diferite, de la galben-verzui la albastru-închis, în funcţie de cantitatea de enzime conţinute în cultură.

M. tuberculosis are spectrul amidazic 3,5,6 (uree, nicotinamida, pyrazinamida), tipul aviar spectrul 5,6 (nicotinamida, pyrazinamida), iar tipul bovin fermentează numai rareori ureea (3). La celelalte micobacterii este variabil cu specia.

Reactivul fenol se prepară punînd 250 g fenol cristalin (anhidru) într-un pahar Berzelius de 500 ml care, la rîndul lui, se pune într-o baie marină la maximum 40°C. Separat se dizolvă 108 g NaOH cristalin în cca 500 ml apă distilată rece. Prin dizolvare încălzindu-se, trebuie răcit apoi la apă de robinet. Cînd ambele substanţe s-au dizolvat, se toarnă hidroxid peste fenolul solubilizat şi se completează la 1000 ml cu apă distilată. Soluţia trebuie să aibă o culoare galbenă-pai şi se poate păstra în sticle brune, etanşe, la frigider, cca 1 lună.

Soluţia de sulfat de mangan se prepară dizolvînd 66,92 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ în 100 ml apă distilată; se păstrează la frigider, în sticle brune.

Apa de Javelle (hipoclorit de sodiu 25%) se prepară conform reţetei obişnuite, dar se diluează pentru lucru în proporţie de 1/10 (1 parte apă de Javelle brută + 9 părţi de apă).

Determinarea sensibilității germenilor față de substanțe antibiotice și chimioterapice

Determinarea sensibilității față de antibiotice (antibiograma)

Această operațiune are o deosebită importanță practică, ea furnizînd date foarte utile pentru aplicarea corectă a măsurilor terapeutico-profilactice. Într-o serie de boli bacteriene (holera aviară, colibaciloza viţeilor, mamitele stafilococice, infecțiile salmonelice, listeriene etc.), administrarea antibioticelor, mai ales în tratamentele de masă, este indicat să se facă numai după ce s-a stabilit spectrul de sensibilitate a agenților cauzali față de acestea. În special în etapa actuală, cînd tulpinile rezistente față de antibiotice, chiar cu spectru larg, sînt din ce în ce mai frecvent semnalate, este imperios necesar, atît din punct de vedere economic cît și din considerente epizootologice, să se acționeze cu substanțe eficiente.

Mecanismul antibiogramei se bazează pe inhibarea dezvoltării unei culturi microbiene puse în contact cu doze variate de antibiotice pe medii de cultură adecvate.

Testarea sensibilității față de antibiotice se poate face prin două metode mai importante: metode difuzimetrice; metode folosind diluții seriate.

Metodele difuzimetrice se bazează pe însușirea soluțiilor de antibiotice de a difuza în mediul de cultură pe diferite distanțe de la punctul în care sînt puse.

Ca medii nutritive se folosesc geloza simplă, geloza cu ser (pentru speciile serofile) sau medii speciale (pentru germenii care se cultivă numai pe asemenea medii).

Ca metode de lucru, există descrise o serie de tehnici: tehnica rondelelor de hîrtie de filtru îmbibate cu diferite antibiotice, tehnica benzilor de hîrtie de filtru, tehnica cilindrilor sau tuburilor de sticlă cu agar, tehnica agarului cu godeuri, tehnica jgheaburilor în agar, tehnica difuziunii verticale, tehnica microcomprimatelor.

Deoarece la noi în țară, la ora actuală cel mai larg folosită este tehnica microcomprimatelor standardizate, va fi descrisă în amănunt numai aceasta.

Pe mediile de cultură amintite, turnate în plăci Petri și zvîntate prin ținerea la termostat cu capacul semideschis timp de 20—30 minute, se face însămînțarea culturii microbiene de cercetat. În acest scop, din

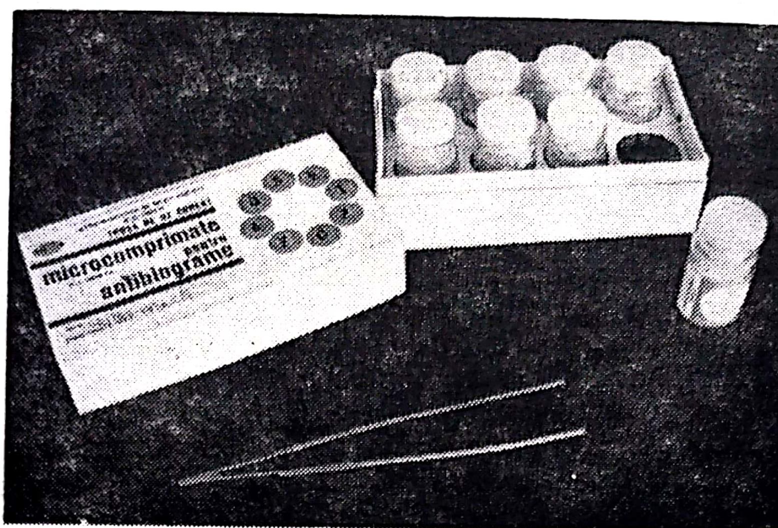


Fig. 27 — Set de microcomprimate cu antibiotice pentru antibiogramă

culturi de 18—24 de ore în bulion, se realizează mai întîi o diluţie de 10^{-3} în ser fiziologic steril (în cazul streptococilor), de 1/200 (în cazul stafilococilor). Diluarea se realizează pentru a obţine colonii foarte dese, dar nu confluente. Din suspensia microbiană rezultată se ia cu o pipetă Pasteur o cantitate de 1—1,2 ml care se depune pe suprafaţa mediului, în apropierea flacării. Prin înclinări repetate se dispersează apoi suspensia pe toată suprafaţa, după care excesul de cultură se scoate cu ajutorul aceleiaşi pipete şi se aruncă în vasul cu dezinfectant. Însămînţarea se mai poate face şi cu ajutorul unui tampon sterilizat, îmbibat cu suspensia bacteriană, cu care se umectează apoi, în mod uniform, întreaga suprafaţă a mediului. Mediul astfel însămînţat se pune din nou la termostat cu capacul plăcii semideschis, pentru zvîntare, timp de 20—30 minute. Apoi, cu ajutorul unei pensete flambate în prealabil, se repartizează microcomprimatele, avîndu-se grija ca acestea să fie la

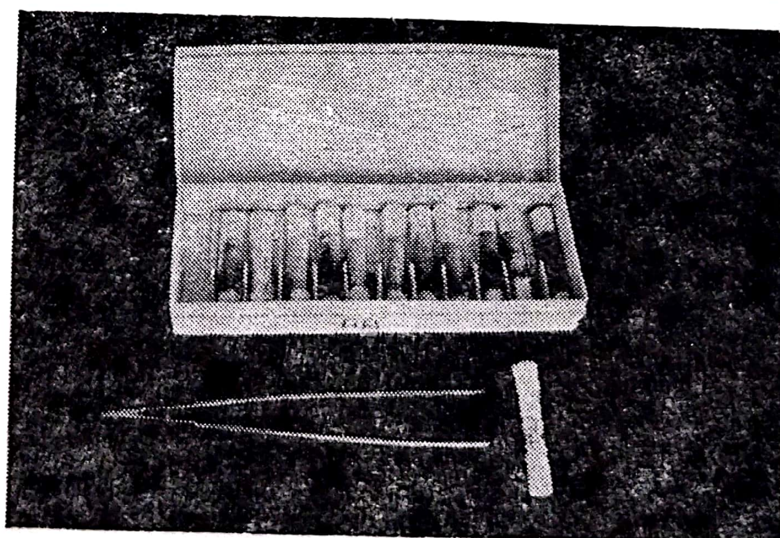


Fig. 28 — Set de rondele cu antibiotice pentru antibiogramă

cca 15 mm de periferia mediului şi la cca 30 mm unul de altul şi ca simbolul imprimat pe microcomprimate, care indică antibioticul corespunzător să fie deasupra (de exemplu A = ampicilină, C = cloramfenicol, E = eritromicină, K = kanamicină, O = oxacilina, P = penicilină G, S = streptomicină, T = tetraciclină, L = lincomicină, No = novobiocină, R = rifampicină, Ne = neomicină, Po = polimixina, B = bacitracină etc.). Pentru o amplasare corectă se pot folosi şabloane care se aşază sub placa cu mediu înainte de a începe operaţiunea. Plăcile se pun apoi la termostat, rezultatele interpretîndu-se după 18—24 de ore de incubaţie. Citirea constă în aprecierea mărimii zonelor de inhibiţie indusă de antibiotic, zone în care coloniile microbiene lipsesc. Diametrul acestora este direct proporţional cu sensibilitatea germenului respectiv, în sensul că cu cît substanţa antibiotică este mai activă, zona de inhibare a dezvoltării microbiene este mai extinsă.

Metodele cu diluţii seriate folosesc soluţii de antibiotic în apă bidistilată neutră sau în soluţii tamponate la pH 7. Majoritatea antibioticelor se dizolvă cu uşurinţă. Aureomicina şi terramicina nu sînt însă

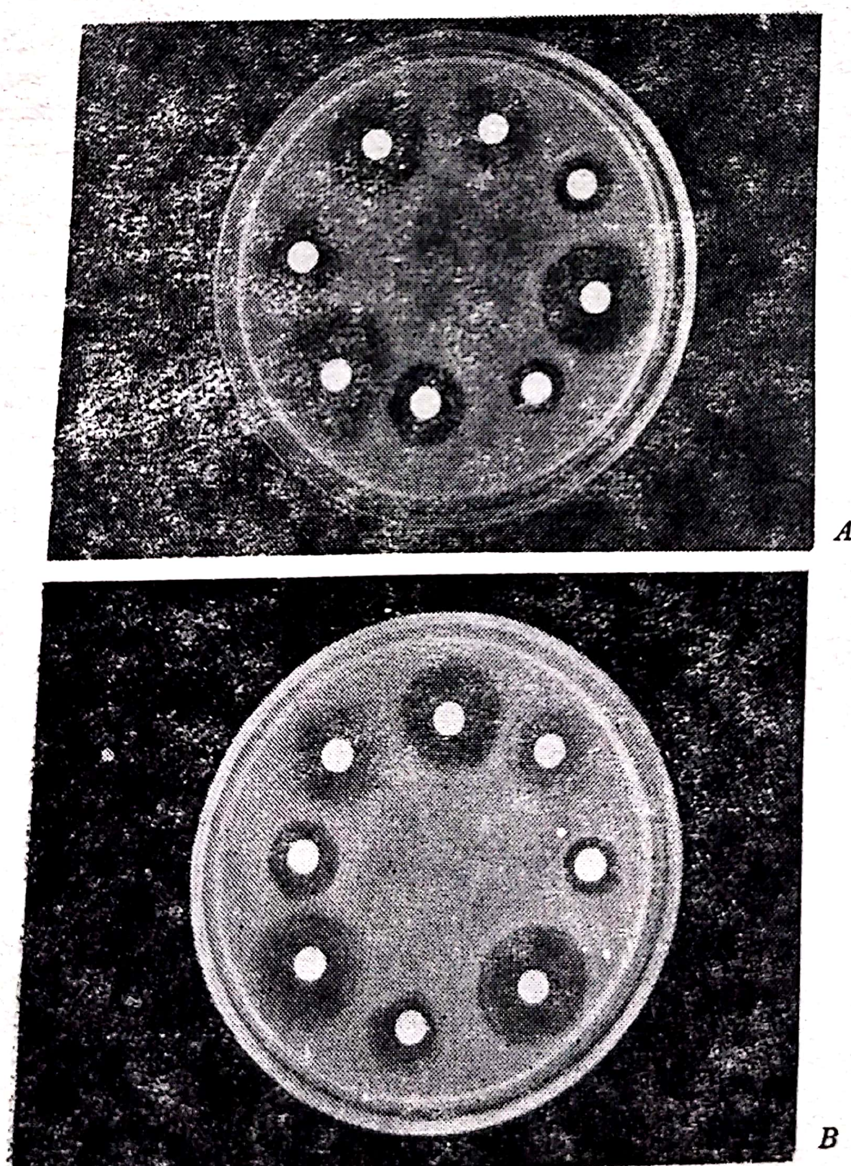


Fig. 29 — Antibiograma (A, B — grade diferite de sensibilitate faţă de antibiotice)

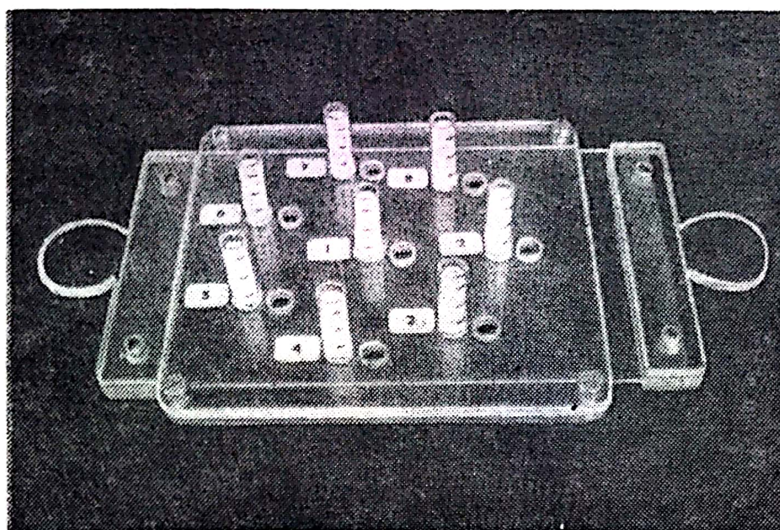


Fig. 30 — Dispozitiv original de distribuire automată a microcomprimatelor de antibiotice în plăcile de agar

solubile decît în apă acidulată (aureomicina se dizolvă într-un amestec de 20 picături dintr-o soluție 1% acid sulfuric p.a. la 10 ml apă, avînd un pH final de 4,2—4,5 iar terramicina în soluție de acid clorhidric la pH 6). Eritromicina se dizolvă în alcool metilic (10 ml metanol pentru 0,025 g eritromicină, se completează pînă la 100 ml cu apă distilată tamponată la pH 8).

Conservabilitatea acestor soluții nu este de lungă durată (penicilina 7 zile la +4°C, streptomicina 10—14 zile, aureomicina 12 zile).

Din soluțiile de antibiotic, se fac diluții succesive în bulion steril, în așa fel încît să se obțină în fiecare tub o concentrație precis cunoscută pe ml. Inițial acestea se fac din 10 în 10, urmînd ca, în cazul că este necesară o determinare mai precisă, să se facă și diluții intermediare. De exemplu, în cazul penicilinei se folosesc diluții de 100; 10; 1; 0,1; 0,01 și 0,001 U.I./ml, streptomicina 100; 10; 1; 0,1; 0,01 și 0,001 micrograme/ml.

În fiecare diluție, inclusiv în tubul martor, fără antibiotic, se însămînțează o cantitate constantă din cultura în bulion de 24 de ore din tulpina de cercetat (în mod obișnuit se pun în fiecare tub 1—2 picături din diluția 1/1000; se pot folosi și culturi tinere de 3—4 ore, nediluate). Se incubează tuburile însămînțate timp de 18—24 de ore la 37°C, după care se face interpretarea. Tubul martor trebuie să conțină o cultură corespunzătoare tipului cultural al speciei.

În cazul germenilor sensibili, în primele tuburi ale seriei, în care cantitatea de antibiotice este mare, mediul rămîne nemodificat, pentru ca în ultimele aspectul să fie apropiat sau identic cu cel din tubul martor.

Titrul bacteriostatic este indicat de cantitatea minimă de antibiotic care a fost capabilă să producă o inhibare totală a dezvoltării.

Indiferent de metoda întrebuințată, o determinare de precizie necesită compararea cu sensibilitatea unor tulpini cu sensibilitate cunoscută și de asemenea, cu antibiotice etalon, avîndu-se în vedere diferențele care pot exista între produsele aparținînd unor firme diferite. Dintre tulpinile microbiene mai frecvent folosite în acest scop, pot fi amintite

tulpina de stafilococ auriu Oxford 12, tulpina de *Bacillus subtilis* Marburg, tulpina de *E. coli* Bruxelles.

Dozarea antibioticelor din sînge și umori se poate realiza fie prin metoda difuzimetrică, fie prin diluții seriate. Metoda diluțiilor este preferată deoarece rezultatele cantitative oferite sînt mai precise. În acest scop, se recoltează aseptic sînge și, după exprimarea serului, se păstrează la frigider pînă în momentul dozării (nu mai mult de 24 de ore). Pentru neutralizarea activității antimicrobiene native a serului se recurge la o prealabilă inactivare la 56°C (încălzirea este însă contraindicată în cazul penicilinei, care este termosensibilă, procedîndu-se la inactivarea prin metode chimice).

În 16 tuburi de reacție sterile se repartizează cîte 1 ml bulion (de preferință operațiunea se face cu 24 de ore înainte pentru a permite și controlul sterilității mediului prin incubare la termostat).

În primele 8 tuburi se fac diluții succesive din antibioticul etalon, fiecare diluție fiind cuprinsă într-un volum de 1 ml (în cazul penicilinei de exemplu, se realizează 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03; 0,015 și 0,007 U.I. pe ml). În celelalte 8 tuburi se fac diluții succesive din serul de examinat: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 — ambele serii de tuburi se însămînțează cu cîte o picătură din cultura de cercetat de 18—24 de ore, diluată 1/1000 și se pun la termostat timp de 24 de ore.

În interpretarea rezultatelor se notează cantitatea minimă de antibiotic și diluția maximă de ser, care au inhibat total dezvoltarea tulpinii sensibile. Diluția maximă inhibată de ser va conține o cantitate de antibiotic egală cu cantitatea minimă inhibantă. Cantitatea de antibiotic din ser, pe unitatea de volum, se obține înmulțind cantitatea minimă de antibiotic întrebuințată cu diluția maximă inhibantă de ser. De exemplu, dacă în seria cu diluțiile de penicilină, ultimul tub în care s-a produs inhibiția corespunde unei cantități de 0,06 U.I. iar în seria diluțiilor de ser ultimul tub în care cultura este inhibată de 1/32, cantitatea de penicilină din ser va fi egală cu 0,06×32=1,92 U.I./ml.

Testarea rapidă a sensibilității față de antibiotice prin metoda microcoloniilor a fost elaborată de MAHONY și CHADWICK și permite obținerea rezultatelor în decurs de 4 ore. Se practică pe plăci cu agar și folosește direct materialul patologic suspect. Suspensiile de antibiotice se fac la o concentrație de 1 mg/ml în apă distilată sterilă. Ele se adaugă agarului proaspăt topit la 50°C și repartizat în strat subțire în plăci. Concentrația antibioticului în agar este:

— penicilina	0,1 și 1,0 unit./ml
— eritromicina	0,4 și 0,8 micrograme/ml
— novobiocina	2 și 36 micrograme/ml
— tetraciclina	5 și 16 micrograme/ml
— streptomicina	5 și 15 micrograme/ml
— cloromicetina	8 și 16 micrograme/ml
— kanamicina	6 și 16 micrograme/ml
— neomicina	6 și 16 micrograme/ml
— colymicina	3 și 10 micrograme/ml
— polimixina B	20 unit./ml
— framycetina	20 micrograme/ml
— lincomicina	1,6 micrograme/ml
— oxacilina	1,0 microgram/ml

— methicilina 5 micrograme/ml
— ampicilina 6 şi 20 micrograme/ml

Metoda se poate practica în cazul fecalelor, urinei, sîngelui sau altor materiale patologice. Fecalele se suspendă mai întîi în soluţie fiziologică sterilă, în proporţie de 1/4. Urina şi sîngele se diluează în proporţie de 1/10 pînă la 1/100. Din aceste diluţii, se fac însămînţările pe plăcile cu mediu conţinînd antibiotice şi pe plăcile martor cu mediu fără antibiotice şi se incubează 4 ore la 37°C. Suprafaţa agarului este apoi examinată la microscopul obişnuit. Mai întîi se examinează plăcile martor. Interpretarea se face astfel:

— creşterea pe plăcile martor şi pe cele conţinînd antibiotice este egală, ceea ce denotă rezistenţă totală;

— creşterea pe plăcile martor, cuplată cu lipsa oricărei dezvoltări pe plăcile însămînţate cu material patologic, denotă sensibilitate totală;

— creşterea unor colonii mai puţin numeroase pe plăcile conţinînd antibiotice faţă de plăcile martor, denotă sensibilitate moderată, interpretabilă variabil, după intensitatea **dezvoltării.**

Determinarea sensibilităţii faţă de antibiotice şi chimioterapice a micobacteriilor. În operaţiunile de testare a acestei sensibilităţi, Uniunea Internaţională contra tuberculozei a stabilit atît jaloanele principale cît şi metodologia de lucru, în vederea uniformizării acestora. În acest sens axarea pe mediul Löwenstein—Jensen a devenit necesară pentru a asigura rezultate comparabile pe plan internaţional. Au fost de asemenea stabilite concentraţii standardizate de tuberculostatice, care se înglobează în mediile de cultură.

În acest scop, din culturi proaspete de micobacterii pe mediul Löwenstein—Jensen se ia o ansă bacteriologică avînd diametrul de 3 mm (diametru interior) încărcată şi se pune într-un balon rotund sterilizat de 150 ml şi care conţine 4 perle de sticlă. Se lasă materialul de pe ansă în balon şi se flambează ansa sub protecţia unui clopot de sticlă montat la becul de gaz (pentru a evita eventuala împrăştiere a germenilor în cursul flambării). Flacoanele se numerotează cu indicativele tulpinilor de cercetat. Se omogenizează temeinic cultura din baloane cu ajutorul perlelor de sticlă, prin mişcări de rotaţie, pînă se obţine o pastă uniformă pe pereţii vaselor (5—10 minute). Se adaugă apoi 1—2 ml de apă distilată sterilă şi se omogenizează din nou, pînă se realizează o suspensie omogenă. Se pregătesc apoi serii de cîte 3 balonaşe Erlenmayer sterile pentru fiecare tulpină, corespunzătoare celor 3 diluţii de germeni cu care se lucrează şi se pun cîte 2 ml apă distilată sterilă în primul balon, 1,8 ml în al doilea şi 1,8 ml în al treilea. Se iau din balonul cu perle conţinînd suspensia unică bacteriană primară, cu ajutorul unei pipete sterile, 0,2 ml şi se pun în primul balonaş cu apă distilată. Suspensia obţinută se ajustează apoi la o turbiditate corespunzătoare unui conţinut de 10 000 000 germeni pe ml prin comparaţie cu o scară Brown.

Din această diluţie se trec apoi în balonaşul următor 0,2 ml obţinîndu-se o suspensie de 1 000 000 germeni pe ml. După omogenizare se iau alţi 0,2 ml şi se trec în ultimul balon, obţinîndu-se astfel diluţia de 100 000 germeni pe ml.

Diluţia finală se lasă în repaus pînă a doua zi cînd se fac însămînţările. Acestea se efectuează luîndu-se o ansă bacteriologică din suspensia respectivă, ceea ce corespunde aproximativ cu 10 000 de germeni.

Însămînțarea se face pe tuburi cu mediu Löwenstein—Jensen avînd înglobate diferitele tuberculostatice, față de care se face testarea.

Concentrațiile principalelor tuberculostatice cu care se lucrează în mod curent sînt următoarele:

- streptomicină 4 și respectiv 10 gamma/ml
- P A S 1 și respectiv 10 gamma/ml
- Nizotin 20 și respectiv 30 gamma/ml
- HIN 0,2 și respectiv 1 gamma/ml
- Etambutol 3 și respectiv 5 gamma/ml
- Rifampicină 20 și respectiv 40 gamma/ml
- Viomicină 20 și respectiv 30 gamma/ml

Tuburile cu mediu se notează înainte de însămînțare cu indicativul tulpinii, tuberculostaticul și concentrația acestuia din mediu.

Suspensia bacteriană de însămînțat se dispersează cît mai omogen pe suprafața mediului, inoculîndu-se din fiecare probă cîte două tuburi.

Din aceeași diluție se însămînțează de asemenea, ca martor, cîte două tuburi pe mediu lipsit de tuberculostatice. Tuburile se astupă cu dopuri de vată și tifon, care se parafinează, sau cu dopuri de cauciuc prevăzute cu orificii de aerisire speciale (un fir de ață trecut prin dop). Se pun apoi la incubație timp de 21 de zile, după care se face interpretarea rezultatelor în funcție de modul de dezvoltare a coloniilor pe mediile cu diferite concentrații de tuberculostatic și prin comparație cu tubul martor. Rezultatele se notează astfel:

+++ creștere confluentă, denotînd rezistența totală față de tuberculostaticul respectiv;

++ colonii izolate, numeroase, ce nu pot fi numărate, denotînd o rezistență moderată;

+ colonii ce pot fi numărate, fiind în număr de 20—100 pe întreaga suprafață a mediului, denotînd o rezistență redusă (existența unui număr de sub 20 colonii se specifică de asemenea, indicînd o rezistență și mai redusă);

0 lipsa dezvoltării, denotînd sensibilitatea totală a tulpinii.

Determinarea acțiunii antibacteriene a substanțelor antiseptice și dezinfectante

Valoarea antibacteriană a unei substanțe se apreciază prin comparație cu o altă substanță, cel mai frecvent folosindu-se fenolul. În acest scop se determină indicele sau coeficientul fenolic, exprimînd de cîte ori o substanță este mai activă sau mai slabă decît fenolul.

Pentru a determina indicele fenolic se fac întîi diluții seriate din soluția antiseptică de cercetat. Se amestecă apoi cîte 1 ml din fiecare diluție cu cîte 1 ml din cultura bacteriană în bulion de 24 de ore.

După 5 minute de la începerea efectuării diluțiilor, deci 5 minute de contact între germeni și substanța de cercetat se fac transplantări cu ansa bacteriologică, din fiecare tub din prima serie de tuburi cu bulion.

După alte 5 minute, deci la 10 minute de contact cu substanța de cercetat, se face o nouă însămînțare din fiecare diluție în altă serie de tuburi cu bulion.

Paralel cu substanța de cercetat se procedează la aceleași operațiuni și cu fenolul, transplantările făcîndu-se la aceleași intervale (5 și 10 minute).

Tuburile însămînțate se pun la incubat și, după 24 de ore, se face citirea. Se notează diluția maximă de fenol și respectiv de substanță de cercetat care inactivează suspensia bacteriană în 10 minute dar nu în 5 minute. Pentru calcularea indicelui fenolic se împart cele două cifre (aceea a diluției active a substanței cercetate la cifra diluției active de fenol). De exemplu, dacă ultima diluție activă la 10 minute dintr-o substanță examinată este 1/10, iar ultima diluție activă de fenol este 1/80, indicele fenolic este dat de formula:

$$\frac{100}{80} = 1,25$$

Determinarea capacităţii de elaborare a unor toxine bacteriene

Unii germeni bacterieni au capacitatea de a elabora în cursul multiplicării lor *in vitro* sau *in vivo* exotoxine care, inoculate la animale de experienţă, determină instalarea unor procese toxice mai mult sau mai puţin grave, în funcţie de doză, calea de inoculare, şi sensibilitatea animalelor respective. Astfel, unii stafilococi, unele salmonele, *E. coli* şi clostridiile (*tetani, botulinum, welchii, septicum* etc.) produc toxine care, de fapt, sînt responsabile de întregul cortegiu de tulburări clinice care survin în cazul toxiinfecţiilor cu aceşti germeni. Pentru a stabili apartenenţa etiologică a tulburărilor constatate şi, implicit, pentru a identifica cu precizie agentul cauzal, se recurge la o serie de teste de punere în evidenţă a toxinelor elaborate, fie în produsele patologice, fie în culturile pe medii artificiale, ale bacteriilor respective. Astfel, se folosesc destul de frecvent proba toxicităţii conţinutului intestinal, cuplată cu proba neutralizării toxicităţii conţinutului intestinal, în cazul dizenteriei anaerobe a mieilor, determinarea toxicităţii filtratelor de cultură în cazul stafilococilor, *E. coli,* bacilului tetanic, *botulinum* etc.

Proba toxicităţii conţinutului gastrointestinal constă în realizarea unei suspensii de conţinut intestinal de la nivelul ileonului într-un volum egal de soluţie fiziologică. Centrifugarea timp de 1/2 oră la 3000 t/minut este urmată de inocularea supernatantului ca atare şi diluat 1/2, 1/4, 1/8 etc. Inocularea se poate face la şoarece, şobolan, cobai, iepure, porumbel, pe diferite căi. Cel mai frecvent se recurge la inocularea pe cale intravenoasă în vena caudală, a şoarecilor. Această cale este cea mai propice şi pentru titrarea toxinei şi este preferată datorită dozei mici care se inoculează. Cantitatea de 0,5 ml determină fenomene toxicoparalitice, soldate cu moartea animalului în 2—10 minute. Moartea este precedată de fenomene de agitaţie şi tremurături musculare, dispnee gravă, ducînd la asfixie. La necropsie se constată congestia ficatului, pulmonului şi masei gastrointestinale.

Inocularea pe cale subcutanată determină fenomene toxice cu evoluţie mai lentă, constînd iniţial din edem, la locul de inoculare, apoi dispnee, pareze şi paralizii musculare, localizate în special la extremităţi. La necropsie se constată edemaţierea regiunilor din zona de inoculare, degenerescenţă hepatică, congestie renală, hipertrofie splenică, serozităţi în cavităţile preformate, lichide biliare în intestin.

Șobolanul se poate inocula, cel mai convenabil, pe cale intraperitoneală (0,1—0,5 ml). Moartea este generată de asfixie, precedată de extensia membrelor posterioare, la 1—10 ore de la inoculare.

La cobai, se pot inocula 1—2 ml pe cale subcutanată sau 0,5—1,0 ml pe cale intravenoasă, fenomenele fiind asemănătoare.

La iepure, se inoculează 2—5 ml pe cale intravenoasă.

La porumbel, doza este de 0,1—0,2 ml pe cale intramusculară.

Proba neutralizării toxicității filtratelor de conținut intestinal se face cu scopul de a demonstra că toxina care a determinat fenomenele toxice în urma inoculării suspensiilor de conținut intestinal aparține unui anumit germen, folosindu-se în acest scop seruri neutralizante corespunzătoare.

În cazul dizenteriei anaerobe a mieilor, suspensia de conținut intestinal (supernatantul de centrifugare) se amestecă cu cantități variabile de ser antitoxic *welchii* și după o incubație de 30 minute la 37°C se inoculează la animale de experiență (preferabil la șoareci). În cazul în care este în cauză toxina corespunzătoare serului respectiv, animalele inoculate nu vor prezenta nici o tulburare.

Testul Dolman. În cazul toxiinfecțiilor alimentare de natură stafilococică, germenii izolați din produsele incriminate se cultivă în atmosferă bogată în bioxid de carbon în agar moale sau pe medii speciale de obținere a toxinei; culturile se încălzesc 15—30 minute la 100°C pentru a distruge fracțiunile toxice termolabile și apoi se filtrează. Inocularea se face în doze de 1—2 ml pe 1 kg de greutate vie, la pisici tinere, în greutate de 400—500 g, pe cale intravenoasă sau intraperitoneală. În cazul că filtratul conține enterotoxina, animalele inoculate vor prezenta o stare de prostrație, ptialism, vomismente, diaree după 15—30 minute de la inoculare și durează cîteva ore. Ele se remit, de regulă.

Se poate folosi, în același scop, și inocularea la broască *(Rana esculenta)* în sacul dorsal, în cantitate de 2 ml. Sacrificarea, la 2 ore, permite, în caz pozitiv, observarea unor intense mișcări antiperistaltice, care merg de la pilor spre cardia. Reacția are un ridicat grad de specificitate, în sensul că filtratele obținute din culturile altor specii bacteriene, cu excepția celor din genul *Proteus,* nu produc asemenea modificări de motilitate.

Testarea patogenității germenilor bacterieni pentru animalele de experiență

Inocularea germenilor bacterieni la animalele de experiență reprezintă o metodă importantă atît pentru identificarea cît mai ales pentru stabilirea rolului lor patogenic. Nu întotdeauna izolarea unui germen dintr-un proces patologic echivalează cu posibilitatea desemnării lui ca agent responsabil de tulburările constatate. Particularitatea unor germeni de a se găsi în diferite țesuturi, sub formă de biofiți, face ca ei să poată fi izolați frecvent prin însămînțări, ceea ce nu înseamnă neapărat că ei trebuie să fie incriminați ca factori etiologici determinanți. De aceea se recurge la stabilirea patogenității lor față de animalele de experiență.

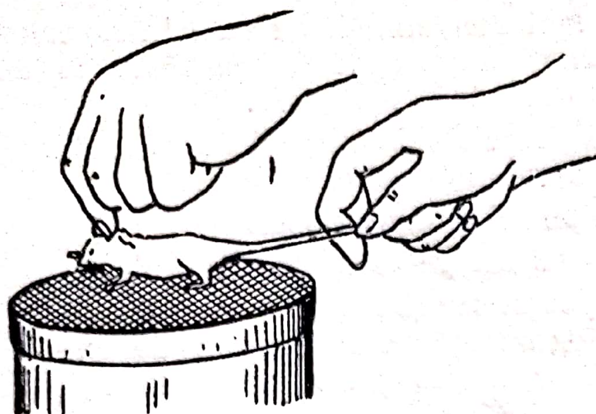



Fig. 31 — Contenţia şoarecelui în vederea inoculărilor experimentale

După manifestările clinice care se instalează, după durata infecţiei şi localizarea proceselor, după tulburările organice care se constată la necropsie în diferite ţesuturi, după modificările histopatologice care se instalează, ca şi după transmiterea în serie a germenilor specifici, se poate stabili cu precizie diagnosticul etiologic.

Inocularea se poate face la diferite specii, pe diferite căi şi în doze variabile. Dintre animalele de laborator cele mai folosite sînt şoarecii, cobaii, iepurii, şobolanii. În cazuri speciale se pot folosi hamsterul, cîinele, pisica, dihorul sau alte specii.

Căile de inoculare şi dozele diferă cu specia bacteriană şi specia animalelor folosite.

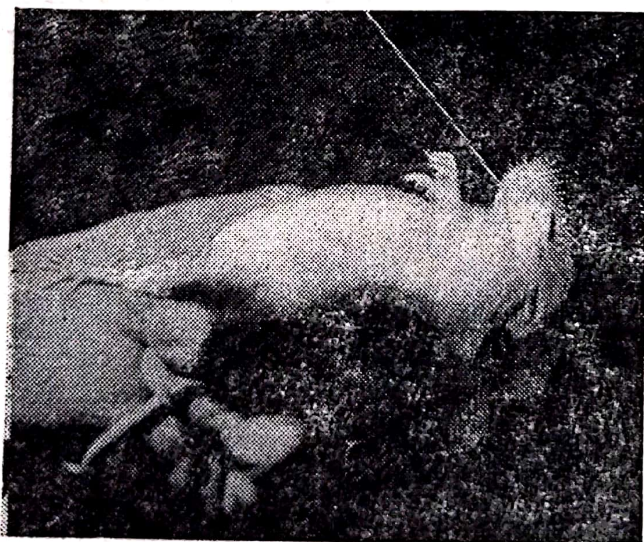


Fig. 32 — Inocularea pe cale orală la şoarece



Fig. 33 — Inocularea pe cale intranasală la şoarece

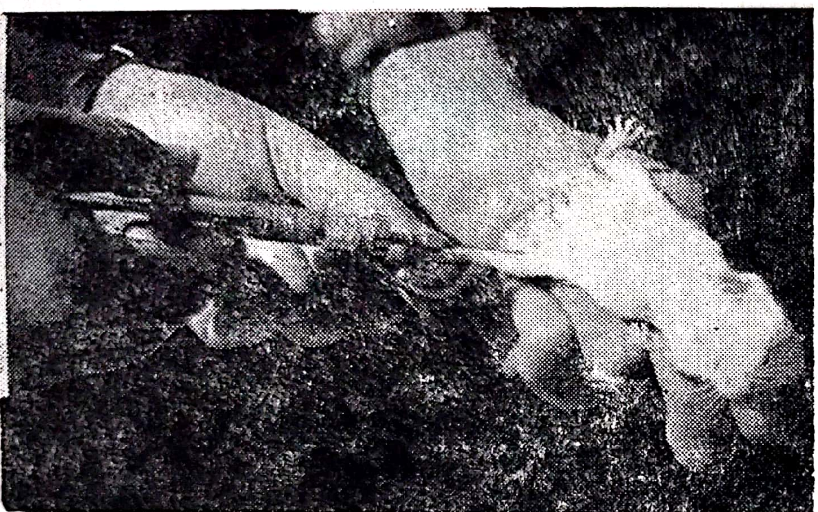


Fig. 34 — Inocularea pe cale subcutanată la șoarece

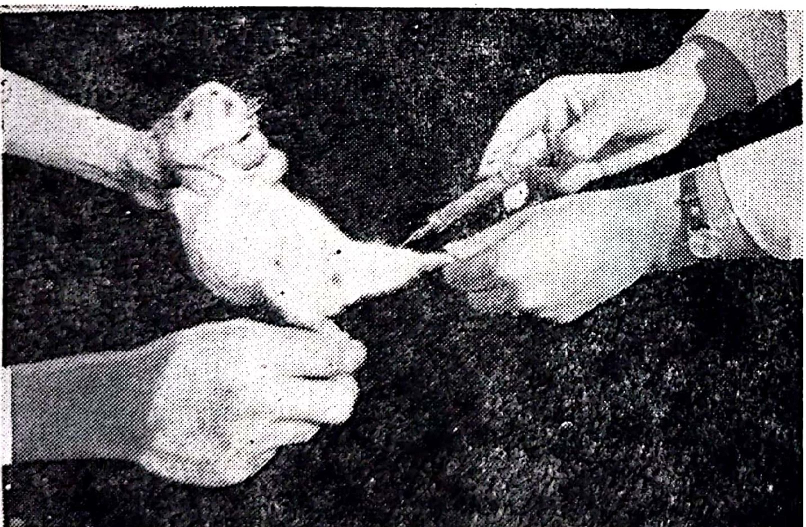


Fig. 35 — Inocularea subcutanată la cobai, la fața internă a coapsei

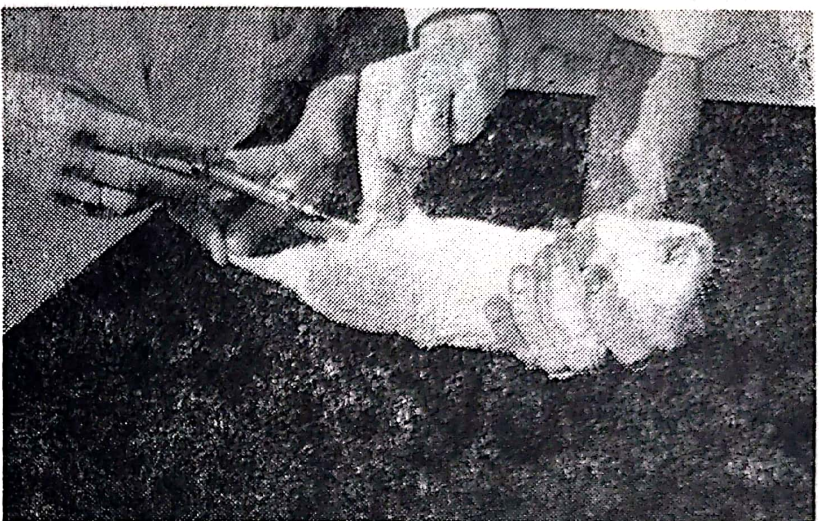


Fig. 36 — Inocularea pe cale subcutanată în regiunea abdominală la cobai



Fig. 37 — Inocularea pe cale intramusculară în mușchii cefei la cobai

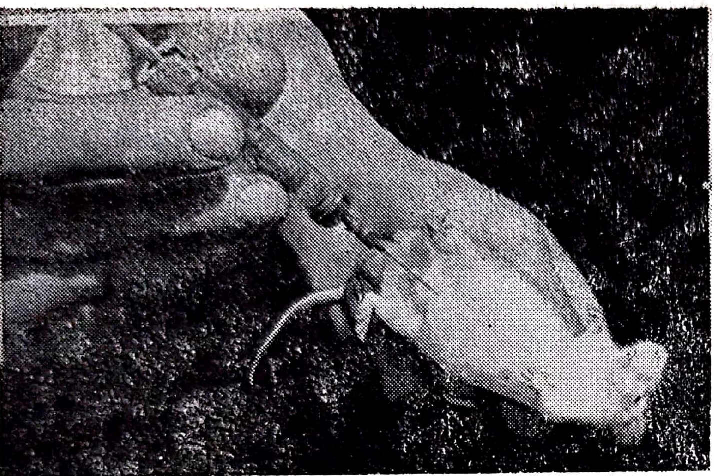


Fig. 38 — Inocularea pe cale intraperitoneală la şoarece

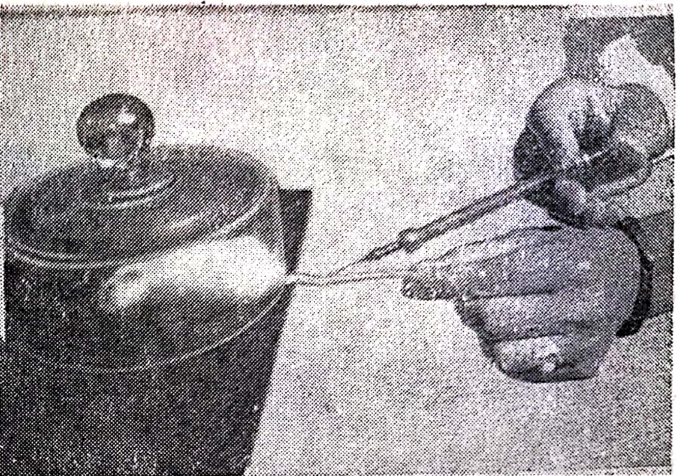


Fig. 40 — Inocularea intravenoasă la şoarece

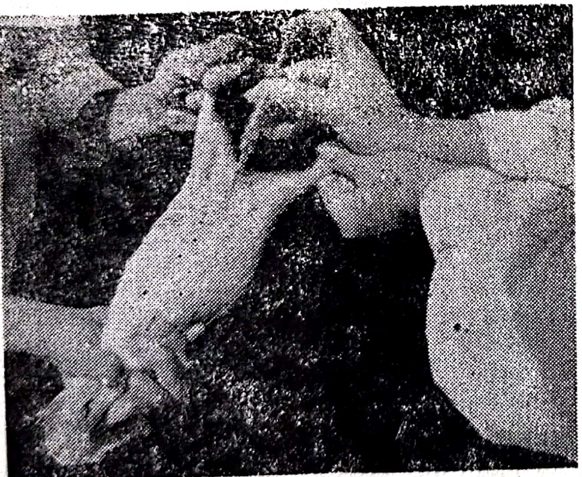


Fig. 39 — Inocularea intraperitoneală la cobai

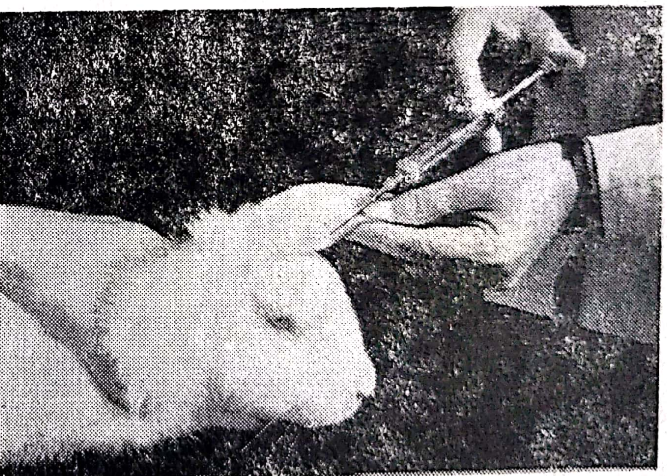


Fig. 41 — Inocularea intravenoasă la iepure

Calea cutanată poate fi epidermică sau intradermică. Calea epidermică se foloseşte prin simpla depunere a germenilor pe suprafaţa pielii pregătită în prealabil (prin tundere, radere şi dezinfecţie) sau prin scarificarea acesteia, în vederea creării unor soluţii de continuitate. Zona de elecţie este variabilă, cel mai frecvent fiind faţa laterală a toracelui, zona dorsală şi lombară.

Calea subcutanată este mai severă decît precedenta şi asigură, spre deosebire de aceasta, o dozare strictă şi — implicit — contactul cu întreaga cantitate de germeni. Zona de elecţie este, fie regiunea flancurilor, fie faţa internă a coapsei.

Calea intramusculară asigură o resorbţie mai rapidă decît precedenta şi se practică, în special, în regiunile bogat musculare (muşchii fesieri, m. coapsei, anconaţi, la animalele mari şi cei cervicali, iar la păsări pectoralii). Uneori se foloseşte inocularea în muşchii cefei.

Calea intraperitoneală asigură o resorbţie şi mai rapidă şi se foloseşte mai ales la speciile greu de manipulat. Se face la jumătatea distanţei dintre torace şi pubis, la 0,5—1 cm lateral de linia mediană. Animalul este ţinut cu abdomenul în sus de către un ajutor şi i se imobilizează membrele şi capul. Operatorul perforează cu acul, printr-o mişcare bruscă, pielea aseptizată în prealabil cu tinctură de iod, apoi stratul muscular şi peritoneul, injectînd suspensia de cercetat, în cantităţi variabile, în funcţie de specie (la iepure pînă la 10 ml).

Calea intravenoasă este cea mai severă, asigurînd o dispersiune generalizată a germenilor în toate ţesuturile vascularizate. Ca urmare, şi dozele sînt mai reduse. Inocularea se face în vena caudală la şoarece (contenţia se face sub un clopot de sticlă, coada rămînînd în afara lui), în vena marginală a urechii la iepure, intracardiac la cobai, în vena axilară la păsări, în vena jugulară sau safenă la speciile mai mari.

Calea intracerebrală se foloseşte mai ales pentru inocularea germenilor cu tropism pentru sistemul nervos central. Inocularea se face sub narcoză cu eter. După contenţionarea animalului cu capul pe masă, de către un ajutor, se procedează la toaleta locală a regiunii dintre protuberanţa occipitală superioară şi protuberanţa orbitală externă la iepure şi cobai (este recomandabilă o prealabilă trepanaţie), la jumătatea dis-

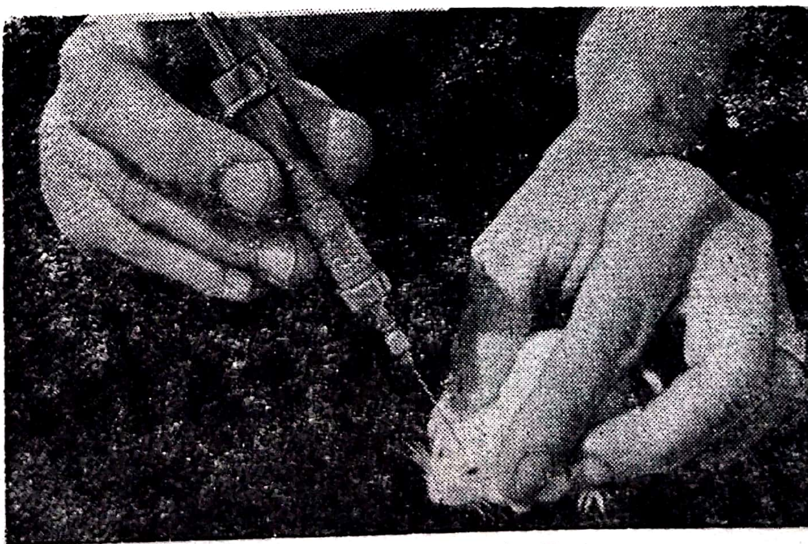


Fig. 42 — Inocularea intracerebrală la şoarece

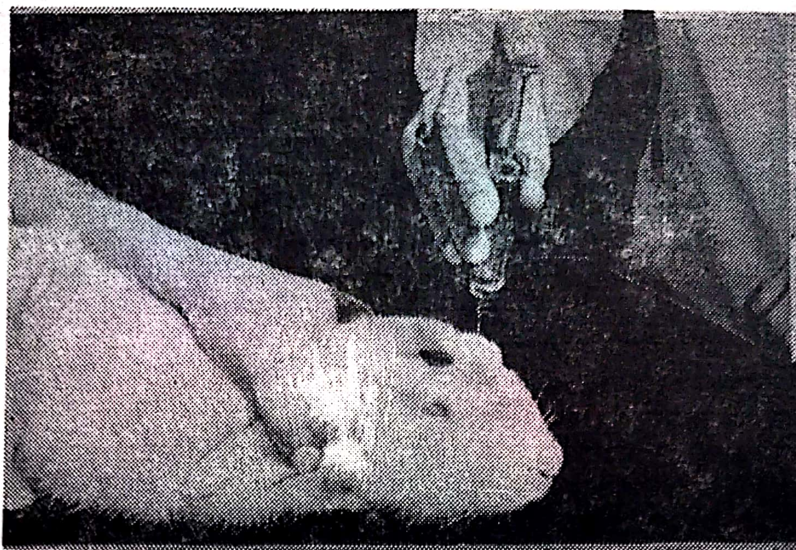


Fig. 43 — Inocularea intracerebrală la iepure

tanței dintre aceste protuberanțe în cazul șobolanului, la jumătatea distanței dintre ochi și linia mediană a craniului la șoarece. Se face inocularea unei cantități de 0,5—1 ml la iepure, 0,1 ml la șobolan, 0,03 ml la șoarece.

Calea respiratorie presupune depunerea materialului bacterian pe mucoasele căilor respiratorii (nazală sau mucoasa căilor profunde). În cazul cînd se preferă căile profunde, instilația nazală este precedată de narcoza animalului.

În principiu, prin inoculările experimentale se pot face aprecieri calitative, privind patogenitatea unei tulpini, cît și aprecieri cantitative (determinarea gradului de patogenitate prin determinarea DLM sau a DL_{50}).

Gravitatea proceselor patologice care se instalează depinde de o serie de factori.

1 — *Receptivitatea speciei* de animale de experiență folosite, față de specia microbiană. Pentru a evita pe cît posibil erorile care pot rezulta din variabilitatea legată de individ, este recomandabil să se realizeze standardizarea genetică a animalelor folosite în experiențe. Crearea de linii cu un spectru de receptivitate cunoscut și creșterea lor în stare pură reușește în bună măsură să uniformizeze animalele din acest punct de vedere. Astfel, pot fi amintite liniile SW, RAT de șoareci albi, linia C_{57} de șoareci negri, linia Fischer de șobolani etc.

2 — *Vîrsta animalului.* În principiu, cu cît vîrsta este mai fragedă receptivitatea este mai mare. În unele cazuri, la vîrsta adultă, animalele sînt total areceptive, cu toate că la vîrsta tînără sînt foarte sensibile.

3 — *Sexul animalului* de experiență are importanță mai ales în cazul germenilor cu predilecție pentru sfera genitală (de exemplu, bacilul morvei, brucelele, *Vibrio foetus* etc.).

4 — *Calea de inoculare* are o mare importanță pentru anumite specii microbiene. De exemplu, pentru *B. anthracis*, infecția experimentală se produce cel mai ușor pe cale intracerebrală și intradermică și mai greu pe cale intraperitoneală sau intravenoasă.

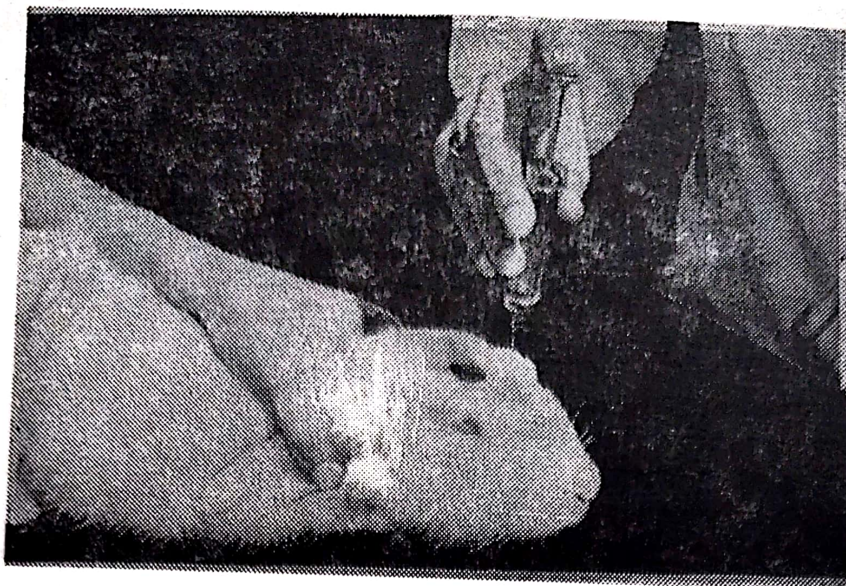


Fig. 43 — Inocularea intracerebrală la iepure

tanței dintre aceste protuberanțe în cazul șobolanului, la jumătatea distanței dintre ochi și linia mediană a craniului la șoarece. Se face inocularea unei cantități de 0,5—1 ml la iepure, 0,1 ml la șobolan, 0,03 ml la șoarece.

Calea respiratorie presupune depunerea materialului bacterian pe mucoasele căilor respiratorii (nazală sau mucoasa căilor profunde). În cazul cînd se preferă căile profunde, instilația nazală este precedată de narcoza animalului.

În principiu, prin inoculările experimentale se pot face aprecieri calitative, privind patogenitatea unei tulpini, cît și aprecieri cantitative (determinarea gradului de patogenitate prin determinarea DLM sau a DL_{50}).

Gravitatea proceselor patologice care se instalează depinde de o serie de factori.

1 — *Receptivitatea speciei* de animale de experiență folosite, față de specia microbiană. Pentru a evita pe cît posibil erorile care pot rezulta din variabilitatea legată de individ, este recomandabil să se realizeze standardizarea genetică a animalelor folosite în experiențe. Crearea de linii cu un spectru de receptivitate cunoscut și creșterea lor în stare pură reușește în bună măsură să uniformizeze animalele din acest punct de vedere. Astfel, pot fi amintite liniile SW, RAT de șoareci albi, linia C_{57} de șoareci negri, linia Fischer de șobolani etc.

2 — *Vîrsta animalului.* În principiu, cu cît vîrsta este mai fragedă receptivitatea este mai mare. În unele cazuri, la vîrsta adultă, animalele sînt total areceptive, cu toate că la vîrsta tînără sînt foarte sensibile.

3 — *Sexul animalului* de experiență are importanță mai ales în cazul germenilor cu predilecție pentru sfera genitală (de exemplu, bacilul morvei, brucelele, *Vibrio foetus* etc.).

4 — *Calea de inoculare* are o mare importanță pentru anumite specii microbiene. De exemplu, pentru *B. anthracis*, infecția experimentală se produce cel mai ușor pe cale intracerebrală și intradermică și mai greu pe cale intraperitoneală sau intravenoasă.

5 — *Doza de germeni.* Unii germeni foarte patogeni pot determina infecţia şi moartea animalelor de experienţă în doze foarte mici, în timp ce alţii nu reuşesc acest lucru în doze foarte mari. De exemplu, *B. anthracis* poate infecta şoarecele în doze de 1—2 germeni pe cale subcutanată, în timp ce *B. cereus*, chiar dacă se inoculează 0,5 ml cultură în bulion de 24 de ore, nu determină constant moartea acestuia.

Animalele inoculate vor fi marcate (prin vopsire în diferite regiuni ale corpului, în cazul şoarecilor, sau cu ajutorul mărcilor, în cazul animalelor de talie mai mare). De asemenea, se impune ca ele să fie menţinute izolat de cele sănătoase, de preferinţă într-o încăpere special destinată animalelor inoculate. Şoarecii se pun în borcane speciale, pe care se notează natura materialului inoculat, doza, calea şi data inoculării.

Manipularea acestor animale se face numai de către personalul instruit în acest scop, în aşa fel ca să se evite accidentele care se pot produce prin muşcături, zgîrieturi, necropsii etc.

Observaţia animalelor inoculate se face cu regularitate la intervale variabile, în funcţie de rapiditatea cu care se presupune că va evolua infecţia, uneori chiar de cîteva ori pe zi. Ea constă în inspecţie, însoţită sau nu şi de alte metode de investigaţie: termometrie, determinarea unor constante hematologice etc.

În general, într-o infecţie experimentală se urmăreşte:

— durata perioadei de incubaţie;

— tabloul clinic al bolii (curba termică, prezenţa unor simptome caracteristice din partea anumitor aparate şi sisteme, apariţia unor modificări decelabile prin examenul clinic, cum ar fi adenitele satelite locului de inoculare şi ulcerele supurante în tuberculoza cobaiului, edemele de la locul de inoculare în infecţia cu *B. anthracis* sau tumorile emfizematoase produse de agenţii gangrenei gazoase);

— modificări ale constantelor hematologice;

— durata infecţiei.

În perioada de stare a bolii se pot face unele examene suplimentare (bacteriologice, serologice, alergice).

Necropsia trebuie executată imediat după moarte pentru a evita invadarea ţesuturilor de către germenii din tractusul digestiv (*E. coli, Cl. septicum, Proteus* etc.). În cazuri extreme, mai ales dacă nu sînt necesare însămînţări din sîngele sau organele acestor animale se poate recurge la păstrarea cadavrelor pentru o perioadă limitată (cîteva ore) la frigider. Necropsia se practică după fixarea animalului în tăvi metalice prevăzute cu dispozitive de fixare a cadavrelor (în cazul cobailor şi iepurilor) sau pe plăci de plută, lemn sau azbest (în cazul şoarecilor şi şobolanilor).

După fixare, partea ventrală a cadavrului se umectează cu o soluţie dezinfectantă şi se practică incizia pielii, de-a lungul unei linii verticale submentopubiene şi a două linii orizontale între cele două perechi de membre. Se dilacerează ţesutul conjunctiv subcutanat, desprinzîndu-se pielea de pe toată partea ventro-laterală, după care se deschide cavitatea abdominală. În acest scop, se face întîi o butonieră în stratul muscular de la pubis, care se prelungeşte pînă la xifoid. Se notează aspectul organelor interne şi mai ales al lichidului peritoneal (epanşamente seroase, hemoragice, purulente etc.), după care, prin incizii laterale de-a lungul ultimelor coaste, se evidenţiază restul organelor abdominale. Prin două incizii interesînd pereţii costali laterali, cît mai aproape de inser-

ţiile vertebrale, se ridică plastronul toracic, evidenţiind organele cavităţii toracice. Se prelevează fragmente din diferite viscere, în recipiente sterile, în vederea examenului bacteriologic şi anatomopatologic sau, preferabil, însămînţările se fac din viscerele aflate în poziţia anatomică normală.

Pentru efectuarea de hemoculturi din cadavrul necropsiat, se fixează cordul cu o pensă, se cauterizează suprafaţa ventriculului drept cu o spatulă încălzită şi se puncţionează ventriculul cu o pipetă Pasteur, sterilă, extrăgîndu-se o cantitate de sînge care se însămînţează imediat pe medii de cultură adecvate. Din celelalte organe, însămînţările se practică după tehnica obişnuită.

După necropsie, cadavrele se distrug prin ardere, iar tăvile se sterilizează prin autoclavare sau cu ajutorul substanţelor chimice.

Determinarea dozei letale minime (DLM)

Doza letală minimă reprezintă cantitatea minimă de germeni capabilă să reproducă o infecţie mortală la o anumită specie de animale de experienţă. Ea este dependentă de o serie de factori, dintre care cei mai importanţi sînt tulpina bacteriană inoculată, specia de animale de experienţă folosită pentru determinare, calea de inoculare, vîrsta şi greutatea animalelor de experienţă etc.

Pentru inoculare se pot folosi culturi microbiene de 24 de ore în mediu lichid (bulion), suspensii de germeni rezultate prin spălarea unor

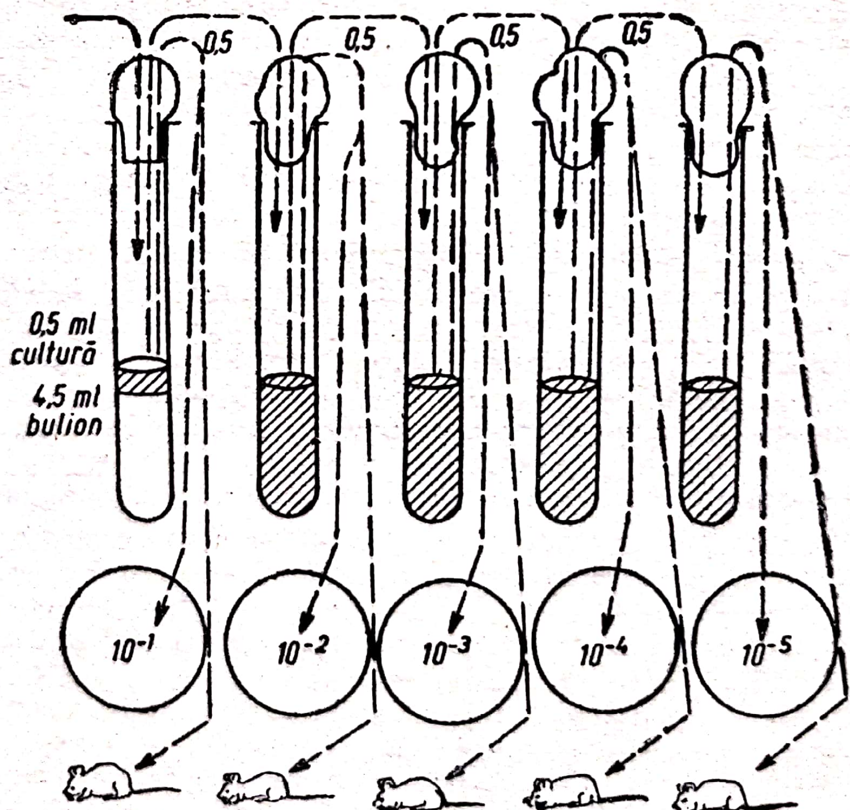


Fig. 44 — Schema determinării dozei minime letale (după Valeria Bica Popii)

culturi proaspete pe medii solide sau prin suspensionarea în soluţie fiziologică a unei cantităţi de cultură de pe mediul solid.

DLM se exprimă fie prin numărul de germeni, fie prin diluţia maximă exprimată exponenţial. Prima modalitate este posibilă în cazul speciilor care pot fi numărate prin una din metodele bacteriologice. Mai frecvent se foloseşte exprimarea prin diluţia maximă capabilă să provoace o infecţie mortală. Ea se referă fie la unitatea de volum (în cazul germenilor din cultură de 24 de ore în bulion), fie la unitatea de greutate (în cazul germenilor raclaţi de pe medii solide sau al organelor bogate în germeni).

Pentru determinare sînt necesare: eprubete, pipete gradate, mojare, seringi şi ace sterile, diluant steril, corespunzător speciei microbiene în cauză (bulion, soluţie fiziologică tamponată etc.), materialul microbian de testat şi un număr suficient de animale de experienţă.

Tehnica de lucru. Se repartizează diluantul în eprubete sterile (de preferinţă în boxă sterilă), în cantitate de 4—5 ml în fiecare eprubetă, în cazul că se folosesc diluţii din 10 în 10 (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} etc.). Se adaugă în primul tub 0,5 ml material microbian, realizîndu-se in acest fel diluţia de 1/10 (10^{-1}). După omogenizare, cu o altă pipetă sterilă, se trec 0,5 ml din eprubetă cu diluţia 1/10 în eprubeta următoare, realizîndu-se diluţia 1/100 (10^{-2}) şi aşa mai departe, pînă la realizarea întregii scări cu care se va lucra. Imediat, se trece la inocularea loturilor de animale, începînd cu diluţia maximă (conţinînd deci, cel mai mic număr de germeni) şi terminînd cu cea mai mică (conţinînd cel mai mare număr de germeni), deci în sens invers faţă de efectuarea diluţiilor. Faptul acesta permite să se folosească aceeaşi seringă pentru toate diluţiile, fără a fi necesară fierberea ei între diluţii. Din fiecare diluţie se inoculează cel puţin 2 animale. Animalele inoculate se marchează, folosindu-se diferite procedee, după posibilităţi, avîndu-se grija de a se nota corect codul marcării.

Animalele inoculate se ţin sub observaţie o perioadă care corespunde răstimpului maxim în care agentul microbian inoculat produce infecţii mortale la specia respectivă. Se notează cazurile mortale pe măsură ce animalele sucombă şi se efectuează examenul bacteriologic în vederea excluderii eventualelor infecţii intercurente.

Dacă proba se execută corect, animalele vor muri într-o anumită ordine: primele, mor cele inoculate cu doza maximă, după care urmează cele inoculate cu diluţii mai mari (cantităţi mai reduse de germeni). Între durata infecţiei şi mărimea dozei, în general, trebuie să existe o proporţie inversă. O asemenea lucrare este corectă cînd animalele inoculate cu diluţia minimă mor în proporţie de 100% iar cele inoculate cu diluţia maximă rezistă în proporţie de 100%.

Doza letală (DL) se poate aprecia fie sub formă de doză letală 100%, DL_{100} sau DLM, fie ca doză letală 50% (DL_{50}). În primul caz concluziile sînt mai aproximative şi constau în exprimarea diluţiei maxime capabile să omoare 100% din animalele inoculate. Aproximaţia acestui mod de exprimare constă în aceea că de regulă mor animalele inoculate cu diluţii superioare dozei care a produs moartea la 100% din animalele inoculate, aşa încît DL reală este situată între diluţia maximă care a produs moartea a 100% din animale şi diluţia la care 100% din animale au rezistat. Pentru acest motiv a fost căutat un mod de exprimare care să

reflecte mai real această relație dintre însușirile patogene ale tulpinii și reactivitatea animalelor. Un astfel de mod de exprimare a fost elaborat de REED și MUENCH, în 1938 și are la bază cîteva principii esențiale:

— numărul minim de animale inoculate cu fiecare diluție (doză) trebuie să fie 5;

— diluția critică 50% trebuie să fie încadrată de cel puțin două diluții superioare și două diluții inferioare;

— în calcularea rezultatului se aplică metoda totalurilor cumulative, adică adunarea pentru fiecare diluție a tuturor animalelor care au murit, plecînd de la diluțiile minime și pînă la diluția respectivă. Se obține în acest fel valoarea letalității cumulative și, prin același raționament, valoarea supraviețuirii cumulative.

De exemplu, pentru a calcula DL_{50} pentru o tulpină microbiană patogenă, se vor face 8 diluții succesive (10^{-1}—10^{-8}) și pentru fiecare din ele vor fi inoculați cîte 5 șoareci, avînd aproximativ aceeași greutate și aceeași vîrstă, deci în total 40 de șoareci. Rezultatele vor fi înscrise într-un tabel (tabelul 2).

Tabelul 2

Calcularea DL_{50}

Nr. crt.	Diluția	Nr. șoarecilor			Totaluri cumulative		Exprimarea procentuală a morților
		Inoculați	Morți	Supraviețuitori	Morți	Supraviețuitori	
1	10^{-1}	5	5	0	24	0	100%
2	10^{-2}	5	5	0	19	0	100%
3	10^{-3}	5	4	1	14	1	93%
4	10^{-4}	5	4	1	10	2	83%
5	10^{-5}	5	3	2	6	4	60%
6	10^{-6}	5	2	3	3	7	30%
7	10^{-7}	5	1	4	1	11	8%
8	10^{-8}	5	0	5	0	16	0%

Cifrele din coloanele „totaluri cumulative" se obțin prin adunarea valorilor înscrise în coloana „Nr. șoarecilor", după cum urmează:

În coloana „morți":

— cifra 24 de la diluția 10^{-1} reprezintă șoarecii morți la diluția respectivă, plus cei morți la toate diluțiile superioare, deci $5+5+4+4+3+2+1$;

— cifra 19 de la diluția 10^{-2} reprezintă șoarecii morți la diluția respectivă, plus cei morți la toate diluțiile superioare, deci $5+4+4+3+2+1$;

— cifra 14 de la diluţia 10^{-3} reprezintă şoarecii morţi la diluţia respectivă plus cei morţi la toate diluţiile superioare, deci $4 + 4 + 3 + 2 + 1$, ş.a.m.d.

În coloana „exprimarea procentuală a morţilor":

— procentul de şoareci morţi se raportează la suma şoareci morţi + şoareci supravieţuitori (totaluri cumulative). Procentul la diluţia 10^{-1} rezultă raportînd cifra 24 la 24 + 0 (100%), la diluţia 10^{-2}, 19 la 19 + 0, (100%), la diluţia 10^{-3}, 14 la 14 + 1, (93%). la diluţia 10^{-4}, 10 la 10 + 2, (83%), la diluţia 10^{-5}, 6 la 6 + 4, (60%), la diluţia 10^{-6}, 3 la 3 + 7 (30%), la diluţia 10^{-7}, 1 la 1 + 11 (8%) iar la diluţia 10^{-8}, 0 la 16 (0%).

Din tabel rezultă că diluţia care ar produce mortalitatea a exact 50% din animalele inoculate se află situată între diluţia de 10^{-5}, care omoară 60% din şoareci şi diluţia 10^{-6}, care omoară 30%. Pentru a afla exact diluţia care ar corespunde unei letalităţi de 50% se calculează factorul de corecţie după următoarea formulă:

$$F = \frac{(A - B)(C + D)}{2(AD - BC)} \quad \text{în care:}$$

A = numărul şoarecilor morţi la diluţia imediat inferioară celei care ar fi omorît 50% (în cazul de faţă 6, corespunzător diluţiei 10^{-5})
B = numărul şoarecilor care au supravieţuit la aceeaşi diluţie (în cazul de faţă 4)
C = numărul şoarecilor morţi la diluţia superioară celei care ar fi omorît exact 50% (în cazul de faţă 3)
D = numărul şoarecilor care au supravieţuit la aceeaşi diluţie (în cazul de faţă 7).

Ca urmare:

$$F = \frac{(6 - 4)(3 + 7)}{2(6 \times 7) - (4 \times 3)} = \frac{2 \times 10}{2(42 - 12)} = \frac{20}{60} = 0{,}33$$

Acest factor se adună cu exponentul 5 (de la diluţia 10^{-5} care omoară 60% din şoareci) şi se obţine rezultatul că diluţia care produce moartea a 50% din animale este de $10^{-5,33}$ sau, mai simplu:

$$\frac{\text{Procentul morţilor la diluţia superioară} - 50}{\text{\% morţilor la dil. sup. lui 50\%} - \text{\% morţilor la dil. infer. lui 50\%}} = \frac{60 - 50}{60 - 30} = \frac{10}{30} = 0{,}33$$

care se adaugă la exponentul diluţiei superioare = $10^{-5,33}$.

Determinarea numărului de bacterii dintr-un produs

În lucrările de bacteriologie legate de igiena alimentelor, a apei, a ustensilelor folosite în industria produselor de origine animală, a mediului ambiant, se impune determinarea numărului de bacterii pe unitatea de volum sau suprafaţă. Ea oferă indicii preţioase cu privire la salubritatea apei, aerului, produselor alimentare etc. constituind substratul măsurilor restrictive care se impun. De asemenea, determinarea numărului de germeni este necesară în cazul controlului unor produse biologice (vaccinuri, seruri etc.).

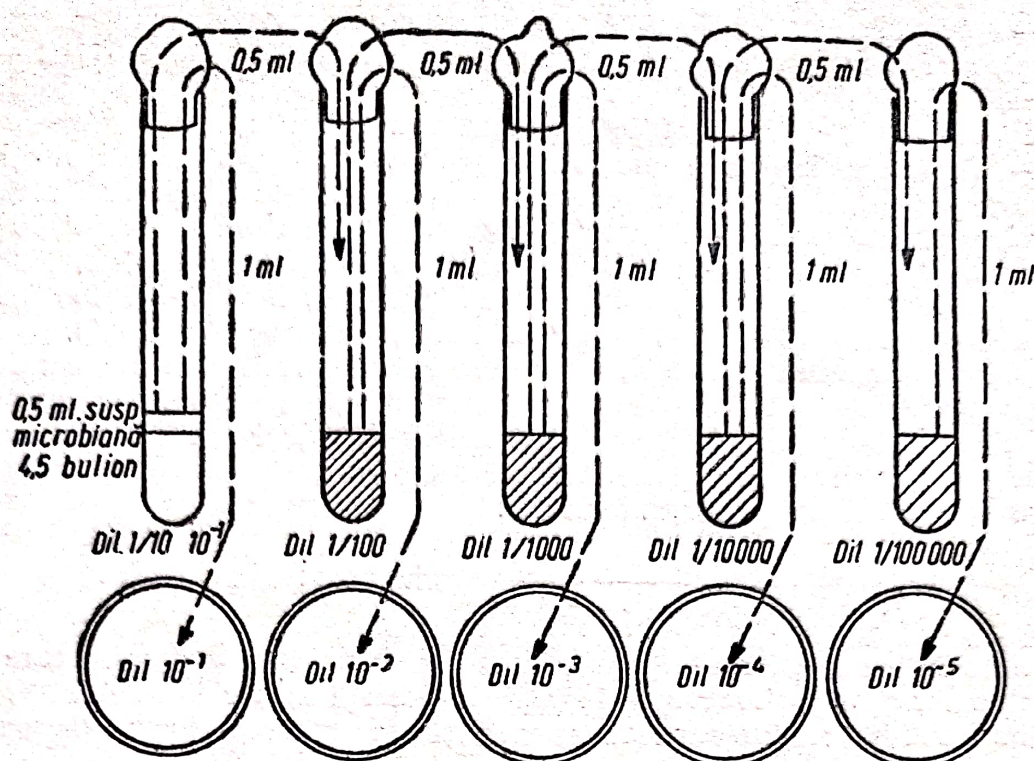


Fig. 45 — Schema efectuării diluţiilor şi însămînţărilor pentru numărătoarea bacteriilor în plăci (după Valeria Bica Popii)

În acest scop se pot aplica două metode mai importante:
— metoda culturilor în plăci;
— metoda nefelometrică.

Metoda culturilor în plăci. Materialul de examinat se recoltează în condiţii de asepsie cît mai riguroasă şi se fac diluţii progresive, din 10 în 10, în bulion. Pentru aceasta, se pun cîte 4,5 ml bulion în atîtea eprubete sterile cîte diluţii sînt necesare a se face (în funcţie de bogăţia de germeni ce se presupune). În primul tub se adaugă 0,5 ml din suspensia de cercetat şi se omogenizează. Se obţine astfel diluţia de 1/10. Cu altă pipetă gradată se trec 0,5 ml în tubul al doilea şi se omogenizează prin aspiraţii şi refulări repetate, obţinîndu-se diluţia de 1/100. Se procedează în mod similar, schimbîndu-se la fiecare diluţie pipeta, pînă la ultimul tub.

Din diluţiile astfel realizate se fac însămînţări în plăci Petri sterile, punîndu-se cîte 1 ml din fiecare diluţie, în fiecare placă. Pentru o mai mare precizie se pot însămînţa, din aceeaşi diluţie, cîte 2—5 plăci. În fiecare placă se toarnă apoi, peste suspensia respectivă, agar topit şi răcit la 45°C şi se omogenizează temeinic, astfel încît bacteriile să se răspîndească uniform în mediul nutritiv, în vederea obţinerii de colonii izolate. Se apreciază că o colonie izolată este rezultatul multiplicării unei singure celule bacteriene.

Plăcile se incubează la 37°C 24—48 ore, după care se numără coloniile care s-au dezvoltat în grosimea stratului de agar, la fiecare diluţie. Numărătoarea se poate face direct sau cu ajutorul unei lupe.

Dacă numărul coloniilor din plăci este mare, numărarea lor se face cu ajutorul unei plăci împărţită în suprafeţe de cîte 1 cm², Cel mai frec-

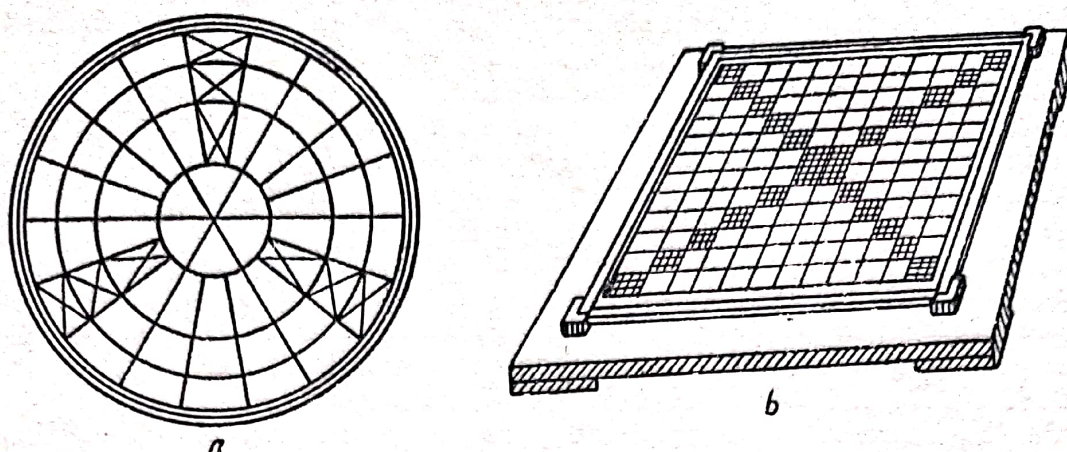


Fig. 46 — Plăci pentru numărătoarea coloniilor bacteriene pe medii solide
a — placa Lafar; *b* — placa Wolfhügel

vent folosite sînt plăcile Wolfhügel și Lafar. Prima are 144 pătrate de cîte 1 cm^2, secunda este circulară și este divizată în 6 sectoare, fiecare subîmpărțit în cîte 10 suprafețe de 1 cm^2.

Placa respectivă se așază sub placa Petri și se numără coloniile din 10—20 suprafețe de cîte 1 cm^2. Media coloniilor pe 1 cm^2 se înmulțește apoi cu suprafața plăcii, obținîndu-se numărul total de germeni din placă, deci din 1 ml de suspensie. Pentru a afla numărul total de germeni din materialul de examinat, numărul coloniilor dintr-o placă se înmulțește cu diluția respectivă. De exemplu, dacă numărul de colonii dintr-o placă însămînțată din diluția 1/100 000 (10^{-5}) este de 25, înseamnă că în materialul inițial au fost $25 \times 100\,000 = 2\,500\,000$ germeni.

Pentru ca rezultatele să fie și mai precise se va face calculul pentru mai multe plăci și în final se face media valorilor obținute.

Metoda nefelometrică se bazează pe folosirea unor scări nefelometrice preparate din pulberi inerte (sticlă pirex pisată), din diferite săruri (clorura de bariu) sau diluții standard de germeni. În practică cel mai frecvent se folosesc scările Brown și McFarland pe bază de clorură de bariu. Fiecărui tub, avînd un anumit grad de turbiditate, îi corespunde cu aproximație o anumită concentrație de germeni.

Pentru determinare se fac suspensii de germeni omogene, care se compară ca turbiditate, cu tuburile din scara folosită. Aprecierea este desigur aproximativă, mai ales dacă se face cu ochiul liber. Metoda se folosește numai în cazul culturilor sau suspensiilor bacteriene, nu și a altor produse.

Obținerea bacteriocinelor

Bacteriocinele sînt substanțe active, elaborate de unele bacterii, avînd o acțiune letală pentru celule bacteriene sensibile, pe suprafața cărora se fixează prin intermediul unor receptori specifici. Spre deosebire de antibiotice, bacteriocinele au un spectru îngust de activitate în sensul că acțiunea lor este condiționată de existența receptorilor celulari specifici.

La ora actulă bacteriocinele sînt clasificate în 2 grupe principale:

a) bacteriocinele fără o structură corpusculară, cu greutate moleculară joasă, nesedimentabile, termostabile, tripsinosensibile; din punct de vedere al constituției chimice sînt foarte heterogene: de natură enzimatică (megacina A, bacteriocinele enterococilor B), lipopolizaharidică (megacinele, stafilococinele, colicina K), proteică (colicinele A, E_1, E_2, E_3, piocinele A_2, A_3) complexă (colicina V);

b) bacteriocinele corpusculare au o structură asemănătoare fagilor compleți, incompleți sau unor componente fagice (capete sau cozi). Sînt sedimentabile, termostabile, tripsinorezistente. Astfel sînt monocinele, bacteriocinele genului *Bacillus*, vibriocina, colicina 15, majoritatea piocinelor (R, R_2, R_3, R_4, R_{28}, C_9, K_{35}, ST_6, TTC, R_{mc}, A_1 etc.).

Pe lîngă aceste două grupe se pare că, recent, au fost identificate bacteriocine cu caractere intermediare cum este megamicina C_x (Kiling principle) de natură proteică, care, deși termolabilă și tripsino-rezistentă, nu are nimic din constituția fagului.

Spre deosebire de antibiotice care sînt substanțe cu greutate moleculară mică și care pătrund în celula bacteriană inhibînd procesele enzimatice ale acesteia sau lezînd ADN-ul celular, cu blocarea funcției de matriță, în cazul bacteriocinelor doar o cantitate mică (cca 1%) pătrunde prin învelișul celular, pentru a se fixa pe fracțiunile ribozomale, restul rămînînd legat de înveliș. Fracțiunea care pătrunde în celulă (fracțiunea solubilă) este responsabilă de efectele letale.

Bacteriocinele au o acțiune bacteriostatică, bactericidă și bacteriolitică, ce se desfășoară în 3 trepte: adsorbția, instalarea alterărilor biochimice celulare și producerea alterărilor morfologice.

Ele joacă un rol important în antagonismul microbian. Pentru activitatea de laborator ele sînt importante sub raportul posibilităților de bacteriocinotipie și respectiv bacteriocinogenotipie, ce se pot aplica în cazul unei serii de bacterii (*Shigella, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Pseudomonas, Clostridium* etc.). O parte din ele au fost încercate și în terapeutică (colicinele, enterocinele, pot inhiba îmbolnăvirile cu *Clostridium perfringens, septicum).*

Detectarea tulpinilor bacteriocinogene se poate face prin metoda dublului strat de agar. În acest scop se procedează astfel:

— se însămînțează tulpinile prezumtiv bacteriocinogene prin înțepare în agar, în plăci Petri (într-o placă pot fi însămînțate mai multe tulpini microbiene; în acest caz pe fundul plăcii se însemnează fiecare tulpină cu indicativul corespunzător);

— se incubează 48 de ore la 37°C;

— se inactivează culturile cu cloroform, punîndu-se cîteva picături pe capacul plăcii și lăsîndu-se 15—30 minute la temperatura camerei; vaporii de cloroform nu alterează bacteriocinele elaborate și difuzate în mediu;

— se însămînțează, peste cultura primară inactivată, tulpina bacteriană indicatoare (sensibilă) incorporată în agar 1,7% topit și răcit la 45°C (0,1 ml cultură proaspătă în bulion la 4—5 ml agar);

— se incubează 24 de ore la 37°C după care se face interpretarea: în dreptul tulpinilor bacteriocinogene se produc zone de inhibiție ușor de decelat.

Se poate recurge și la metoda prin spotare, în care se depun picături (spoturi) din culturile presupuse a fi bacteriocinogene, în puncte

separate, spre periferia plăcii Petri, cu agar nutritiv. Se incubează 48 de ore, se tratează cu cloroform, după care peste culturile rezultate, se depun picături din cultura în mediu lichid, a tulpinii sensibile, astfel încît să depășească marginile culturii inițiale. Se incubează la 37°C, timp de 24 de ore și se interpretează rezultatele: în dreptul tulpinilor bacteriocinogene se vor observa zone de inhibiție.

Se poate folosi, de asemenea, tehnica însămînțărilor liniare perpendiculare.

Identificarea bacteriocinelor obținute se face prin compararea specificității lor față de tulpinile sensibile cu specificitatea unor bacteriocine standard.

Prepararea bacterinelor

Practica de teren impune adesea prepararea unor mijloace de imunoprofilaxie specifică față de unele îmbolnăviri cu caracter local (infecții de grajd, interesînd un număr mai mult sau mai puțin ridicat de animale sau indivizi izolați) și față de care nu se dispune de vaccinuri preparate pe plan centralizat. Prepararea unor vaccinuri cu tulpini „de focar“ devine adesea singura măsură specifică salutară în rezolvarea unor situații epizootologice particulare.

Pentru prepararea bacterinelor din diferiți germeni, există diferite procedee dintre care cele mai simple și în același timp corespunzătoare se bazează pe următoarele:

a) cultivarea germenilor pe medii adecvate. Culturile pe medii lichide necesită o prelucrare mai redusă decît cele pe medii solide, deși acestea din urmă realizează concentrații mai ridicate de germeni pe unitatea de volum. În cazul germenilor mai puțin pretențioși (coliformi, salmonele, pasteurele, stafilococi etc.) se poate face cultivarea pe medii obișnuite. În cazul germenilor serofili (streptococi) se adaugă ser steril în proporție de 2—5% care, pentru a evita șocul, este preferabil să provină de la aceeași specie animală cu aceea pentru care se prepară bacterina;

b) bulionul se repartizează în flacoane în cantități de cîte 250 ml, în cazul cînd este nevoie de cantități mai mari de bacterină.

Pentru fiecare flacon se însămînțează cîte un tub conținînd 5—10 ml bulion, cu tulpina bacteriană respectivă și se incubează la 37°C. Cînd turbiditatea din tuburi este evidentă sau se apreciază că dezvoltarea este maximă, se fac frotiuri pentru controlul purității culturii. Dacă ea este pură, fiecare flacon conținînd 250 ml mediu, încălzit în prealabil la 37°C, se însămînțează cu cantitatea de cultură conținută de un tub. Flacoanele sînt incubate apoi 18—24 de ore (dacă este nevoie și mai mult). Pentru a mări concentrația culturii se poate folosi aerarea sau agitarea periodică;

c) cînd se apreciază că cultura s-a dezvoltat suficient, se face controlul purității prin examenul morfologic în frotiuri. Dacă este pură, se formolează 0,3% și se mertiolează 1/10 000 (mertiolatul este necesar pentru a inhiba dezvoltarea ciupercilor). În cazul stafilococilor inactivarea se face mai frecvent prin încălzire la 56°C timp de o oră în prezența feno-

lului în proporţie de 0,5%. Cultura astfel tratată se incubează apoi 18—24 de ore la 37°C şi se supune următoarelor teste de sterilitate şi inocuitate:

1 — se inoculează cîte 0,1 ml bacterină din fiecare flacon, în cîte două tuburi cu bulion obişnuit şi cîte două tuburi cu bulion cu ficat. Două tuburi (din fiecare mediu cîte unul) se incubează la termostat la 37°C iar celelalte două la temperatura camerei, timp de o săptămînă;

2 — se inoculează cîte 3 şoareci adulţi, pe cale subcutanată cu cîte 0,2 ml bacterină şi se ţin în observaţie 1 săptămînă;

3 — dacă tuburile însămînţate rămîn sterile iar şoarecii rămîn sănătoşi, bacterina se poate folosi;

4 — dacă este posibil se inoculează un animal din specia pentru care s-a preparat bacterina, pentru a vedea dacă apar sau nu reacţii nedorite.

Bacterina trebuie notată cu date privind tipul, utilizarea, doza, conservarea, data preparării.

Dacă este necesară o cantitate redusă de bacterină (pentru un singur animal) este preferabilă cultivarea pe geloza sînge. Cultura se spală cu o cantitate mică de soluţie salină formolată 0,3%, se incubează, apoi se diluează cu o soluţie salină fenolată 0,5% pînă la turbiditatea dorită. Pentru animalele mici se preferă ca conservant fenolul, deoarece spre deosebire de formol, nu produce iritaţii evidente. Se fac aceleaşi teste de sterilitate şi inocuitate.

Examenele serologice ca metode de decelare a infecţiilor bacteriene şi virale la animale

Conflictul activ între macro- şi microorganism are ca rezultat, în afară de producerea unor tulburări morfologice şi funcţionale, şi o mobilizare a resurselor defensive, capabile să facă faţă infecţiei şi să restabilească echilibrul fiziologic în organism. Aceste resurse presupun mijloace variate: elaborarea de substanţe bactericide (conţinute de diferite secreţii, umori şi elemente celulare ca: lizozimul, betalizina, leucinele, plakinele, alexina, properdina, bactericidina), capacitatea de a îngloba şi distruge germeni (fagocitoza) sau producţia unor elemente specifice, ca răspuns la incitarea provocată de diferitele tipuri de agenţi patogeni. Aceste elemente specifice sînt anticorpii şi au rolul de a neutraliza valenţele nocive ale microorganismelor sau substanţelor străine organismului.

După natura lor şi după modul lor de acţiune, anticorpii pot fi aglutinanţi, precipitanţi, neutralizanţi, fixatori de complement, sensibilizanţi. Pe aceste însuşiri, care presupun cuplarea specifică a anticorpilor cu antigenele, se bazează o serie de reacţii cu valoare diagnostică uneori deosebit de importantă.

Aceste reacţii imunologice pot fi folosite în două scopuri mai importante:

a) precizarea diagnosticului unor stări patologice pe baza decelării în sînge, secreţii sau diferite ţesuturi a anticorpilor specifici care au luat naştere în organism, în urma contactului cu agentul etiologic respectiv. În acest scop, se folosesc unul sau mai multe antigene cunoscute, căutîndu-se, prin reacţiile serologice, identificarea anticorpilor. Trebuie specificat că aceste reacţii dispun de un înalt grad de specificitate, în sensul că cuplarea antigenului se face numai cu anticorpii corespunzători, deci pozitivitatea indică fie boala în cauză, fie contactul anterior al organismului cu agentul etiologic respectiv;

b) identificarea agentului etiologic care a provocat starea de boală, folosindu-se seruri cunoscute, preparate în prealabil pe animale de experienţă. Dispunîndu-se de serii variate de asemenea seruri, dotate cu o înaltă specificitate şi izolîndu-se în stare pură agentul cauzal, prin mijloace de laborator, se poate stabili, cu ajutorul reacţiilor serologice, genul, specia sau tipul care a determinat procesul patologic. Faptul este important atît pentru precizarea diagnosticului, cît şi sub raport profilactic, permiţînd instituirea celor mai adecvate măsuri de prevenire. Aşa de exemplu, stabilirea exactă a serotipului de leptospire dintr-un focar are o mare importanţă

în aplicarea vaccinărilor cu serotipurile care acţionează în acel focar, asigurînd în acest fel reuşita acţiunilor de imunoprofilaxie specifică.

Elementele necesare oricărei reacţii serologice sînt:

— antigenul constituit dintr-o suspensie microbiană (vie, atenuată sau inactivată) dintr-un extract (microbian, organic etc.), o suspensie de organe, secţiuni la criotom (pentru imunofluorescenţă) etc.;

— anticorpul aflat în serul sau secreţiile animalelor bolnave sau trecute prin boală.

Pe lîngă aceste două elemente indispensabile, sînt necesari electroliţi, iar în unele reacţii serologice mai intră şi o serie de elemente care, fie că favorizează vizualizarea reacţiei, fie că permit evidenţierea mai pregnantă a intensităţii reacţiilor (coloranţi, ioni marcaţi, sisteme indicator nespecifice etc.). Intensitatea unei reacţii este variabilă cu cantitatea de anticorpi existenţi în serul respectiv, precum şi cu unele condiţii de desfăşurare a acesteia. În general, ea se notează cu ++++, +++, ++, +, ± şi —, după criterii variabile, în funcţie de natura reacţiei.

Pentru a mări gradul de obiectivitate a reacţiilor serologice, este necesar să se folosească întotdeauna martori. Aceştia sînt şi ei variabili, în funcţie de reacţie, dar, în principiu, minimum doi sînt strict necesari: martorul pentru reacţia pozitivă şi cel pentru reacţia negativă. La aceştia se mai adaugă după caz, martorii pentru diluant şi alte elemente care intră în reacţie. Ei sînt în măsură să certifice că reacţia s-a efectuat între parametrii optimi şi că, deci, rezultatele ei sînt corecte. Depistarea în organismul animalelor bolnave, suspecte sau trecute prin boală, a anticorpilor specifici, constituie, ca urmare, procedee de a cunoaşte natura proceselor infecţioase şi permit orientarea justă a măsurilor de prevenire sau combatere.

Dintre cele mai importante reacţii serologice folosite în practica de diagnostic, pot fi enumerate următoarele:

A) *Hemoaglutinarea rapidă pe lamă (RHAR)* constă în punerea în contact a sîngelui integral, proaspăt recoltat, cu un antigen destinat special acestui scop. Existenţa anticorpilor specifici în sîngele cercetat se soldează cu aglutinarea particulelor de antigen sub forma unor grămezi vizibile cu ochiul liber. Spre exemplificare va fi dată mai jos, tehnica reacţiei de hemoaglutinare rapidă pe lamă în tifopuloroză.

Pentru efectuarea reacţiei este nevoie de următoarele:

— lame de sticlă curate şi bine degresate;

— anse metalice cu diametrul ochiului de 3 mm:

— flacără pentru flambarea anselor (lămpi de spirt, benzină sau aragaz);

— pipete Pasteur sau seringi de 1 ml cu ac fin, pentru repartizarea antigenului pe lame;

— vată, alcool, foarfece;

— apă distilată sau ser fiziologic, într-un vas de sticlă;

— cuşti pentru izolarea exemplarelor pozitive, precum şi pentru izolarea celor cu alte afecţiuni (tbc, leucoză, micoplasmoză etc.);

— antigen pullorum (suspensie în apă distilată hiperclorurată şi citratată, de corpi microbieni de *Salmonella pullorum)* conservat corespunzător şi agitat înainte de utilizare;

— ajutoare pentru prindere şi contenţionare.

Reacţia se execută într-o încăpere închisă, fără curenţi de aer şi fără praf, bine luminată natural, în care temperatura să fie de 18—20°C.

Tehnica de lucru. Se depune pe lamă, cu pipeta Pasteur sau cu seringa,o picătură de antigen. După dezinfecţia cu alcool a crestei şi foarfecelui (necesară pentru a evita transmiterea în serie a unor boli infecţioase, cum ar fi de exemplu leucoza aviară) se taie puţin din vîrful unui lob al crestei, lăsîndu-se să se scurgă primele 2—3 picături de sînge. Cu ansa acului se recoltează o picătură de sînge, care se amestecă cu cantitatea de antigen de pe lamă. După fiecare recoltare, ansa acului se spală prin introducerea în vasul cu apă distilată, apoi se flambează şi se răceşte. Amestecul de pe lamă se omogenizează bine, prin înclinări repetate, iar după 3 minute se face citirea. Reacţia poate fi: negativă cînd amestecul antigen-sînge rămîne omogen şi pozitivă, cînd în amestec apar granule albicioase, grunjoase, întîi la periferia picăturii, apoi în toată masa amestecului, în timp ce restul lichidului se limpezeşte. Aceşti grunji cresc în dimensiuni prin confluare. Trebuie subliniat faptul că grunjii au o culoare albă-cenuşie şi nu trebuie confundaţi cu eventuale aglutinate de hematii care au o culoare roşie. Se pot întîlni şi reacţii întîrziate, cînd abia la sfîrşitul celor 3 minute încep să apară aglutinatele. În aceste cazuri, operaţia se repetă, punîndu-se în aceeaşi cantitate de antigen 2—3 anse de sînge, iar observaţia se va prelungi 4—5 minute.

În cazul reacţiei de hemoaglutinare pentru diagnosticul tuberculozei la păsări, se procedează în aceeaşi manieră, doar că se foloseşte un antigen micobacterian, preparat din tulpini de *M. avium,* suspensionate în soluţie fiziologică tamponată.

În cazul brucelozei la mamifere, antigenul folosit pentru RHAR, este colorat cu feniltetrazolium citratat şi are culoarea roşie-violacee, ceea ce face mai dificilă interpretarea.

B) *Seroaglutinarea rapidă pe lamă* se bazează pe acelaşi principiu, doar că în loc de sînge integral se foloseşte serul exprimat de sîngele recoltat de la indivizii suspecţi. Se practică, mai ales cînd operaţiunea nu se face la locul recoltării, fiind necesar transportul probelor la laborator. Se foloseşte, de asemenea, în munca de tipizare în laboratoare, cînd se pun în contact seruri cunoscute cu germeni necunoscuţi. În acest fel se poate pune un diagnostic operativ *(E. coli, Salmonella).*

În acest din urmă caz, se foloseşte tot un antigen corpuscular — suspensia bacteriană obţinută prin spălarea culturilor pe agar, sau prin omogenizarea, direct pe lamă, a unei picături de soluţie fiziologică cu o cantitate de cultură raclată de pe mediile solide. Suspensiile trebuie să fie dense şi omogene. Tulpinile care aglutinează spontan, numai datorită electroliţilor conţinuţi de soluţia fiziologică, nu pot fi folosite în acest scop. Pentru aprecierea reacţiei este de asemenea necesar controlul acţiunii serului normal al speciei de la care provine serul respectiv asupra antigenului. Dacă serul normal al unei specii conţine aglutinine nespecifice faţă de antigenul cu care se lucrează, înseamnă că el nu se pretează pentru practicarea diagnosticului serologic.

Citirea reacţiei de seroaglutinare rapidă se face prin aprecierea intensităţii şi rapidităţii cu care se produce aglutinarea corpilor bacterieni din antigen. Înclinarea repetată a lamei pe care s-a făcut amestecul de antigen şi ser, accelerează apariţia aglutinatelor. Aglutinarea poate fi de tip granular (particule mici) sau de tip floconos (particule mari). Primul

este de regulă propriu reacţiilor care se petrec între antigen şi anticorpii somatici, iar secundul între antigen şi anticorpii flagelari. Pentru a uşura observarea apariţiei aglutinării este bine ca citirea reacţiei să se facă pe un fond închis (un carton sau o hîrtie de culoare neagră). Uneori reacţia este atît de discretă încît numai cu greutate se poate observa apariţia granulelor în amestec. În acest caz se poate recurge la examinarea la lupa obişnuită sau la un dispozitiv special destinat acestui scop (aglutinoscop).

C) *Seroaglutinarea lentă (RSAL),* în tuburi, are avantajul, faţă de precedentele, că permite şi stabilirea titrului anticorpilor din serul suspect, ceea ce adesea dă indicii preţioase asupra stadiului procesului infecţios. Aşa de exemplu, în unele boli cu evoluţie lentă, examene serologice repetate, prin determinarea titrurilor anticorpilor, permit aprecierea dinamicii acestora şi, implicit, evaluarea caracterului evolutiv al infecţiei.

Pentru efectuarea reacţiei se pune în contact suspensia de antigen cu diluţii variabile de ser suspect şi se urmăreşte, după o incubaţie corespunzătoare, apariţia fenomenului de aglutinare, tradus prin formarea, la fundul eprubetelor — în cazul în care reacţia este pozitivă — a unui depozit carateristic, însoţit de clarificarea stratului superior. În funcţie de concentraţia anticorpilor, aglutinarea va fi prezentă într-un număr mai mare sau mai mic de tuburi din seria de diluţii efectuate.

Intrepretarea reacţiei constă în observarea densităţii optice a lichidului supernatant şi a gradului de depunere a aglutinatului la fundul eprubetelor. Intensitatea reacţiei depinde de cantitatea de anticorpi din serul de cercetat:

1 — aglutinarea completă, notată cu ++++, constă în clarificarea totală a supernatantului şi depozitarea particulelor aglutinate de antigen la fundul eprubetei, sub forma unei umbrele răsturnate, datorită franjurării marginilor ce se întind şi pe pereţi (presupune aglutinarea a 100% din corpii bacterieni — antigen);

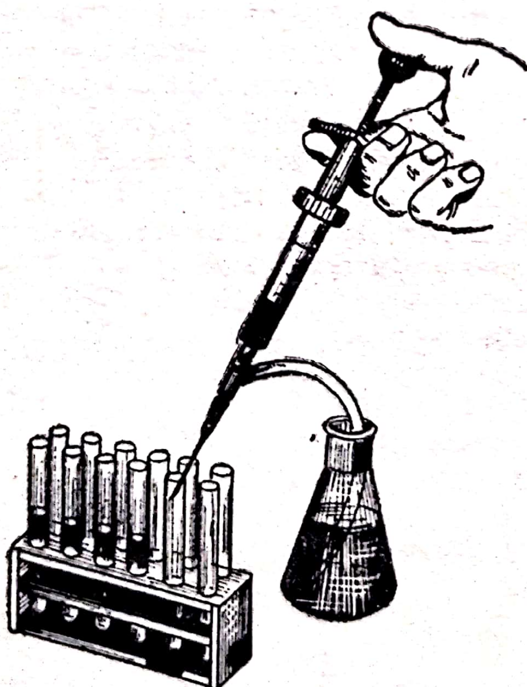


Fig. 47 — **Distribuirea cu ajutorul seringii automate**

2 — aglutinarea aproape completă, notată cu +++ constă în clarificarea 75% a supernatantului şi un depozit asemănător cu precedentul, dar mai redus (presupune aglutinarea a peste 50% din antigen, dar nu 100%);

3 — aglutinarea moderată, notată cu ++ constă în turbiditate moderată — 50% — a supernatantului, cu depozit mai redus, eventual umbreliform (presupune aglutinarea a aproximativ 50% din particulele de antigen);

4 — aglutinare slabă, notată cu +, constă în turbiditate mai intensă a supernatantului, aproape aceeaşi cu a tubului martor negativ şi depozit redus (presupune aglutinarea a maximum 25% din antigen);

5 — absența oricărei aglutinări, notată cu —, constă în turbiditatea supernatantului identică cu a tubului martor negativ.

Pentru o mai corectă exemplificare, va fi dată tehnica efectuării seroaglutinării lente pentru diagnosticul brucelozei la animale așa cum se practică ea în laboratoarele sanitare veterinare, la ora actuală.

Pentru executarea reacției sînt necesare:

— antigenul brucelic (aglutinogenul), preparat de I.C.V.B. „Pasteur", al cărui titru și termen de valabilitate sînt indicate pe flacon. Păstrarea antigenului se face la + 4°C. Pentru ca rezultatele să fie comparabile cu cele obținute pe scară internațională, acest antigen este standardizat față de serul etalon internațional adoptat de O.M.S., O.I.E. și F.A.O. Antigenul este astfel dozat încît, în prezența unei diluții de 1/1000 a serului etalon să producă o aglutinare de intensitate notabilă cu ++ (50%);

— soluție fiziologică 8,5‰;

— serul de examinat, care trebuie să fie limpede și fără hemoliză;

— eprubete de reacție (100/12 mm), stative, pipete, eventual seringi sau pipete automate de repartizare a ingredientelor.

Pregătirea antigenului. Flacoanele sau fiolele conținînd antigenul brucelic se omogenizează bine, după care se face suspensionarea în soluție fiziologică fenolată 5‰, în funcție de titrul indicat pe etichetă și în cantitate suficientă pentru numărul de probe care se pun în lucru în șarja respectivă. Pentru fiecare probă de ser se calculează un volum de 6,1 ml suspensie de antigen.

Deoarece în mod curent se lucrează cu diluțiile de ser 1/25, 1/50, 1/100, efectuate direct în antigen, pentru fiecare probă se vor pune în reacție 3 eprubete în care se repartizează următoarele cantități:

— prima eprubetă: 3,6 ml antigen în diluația de lucru + 0,15 ml ser de examinat; se va omogeniza prin aspirații și refulări repetate (de 4—6 ori) obținîndu-se diluția de 1/25;

— a doua eprubetă: 1 ml antigen + 1 ml amestec din prima eprubetă, obținîndu-se diluția 1/100.

Fiecare șarjă de probe va fi însoțită de un martor de ser pozitiv (brucelic) precum și un martor de ser sigur negativ.

Stativele se pun la termostat la 37°C timp de 18—20 ore. După acest interval, se scot, se lasă în repaus 30 de minute (evitîndu-se orice agitare), după care se face citirea rezultatelor, de preferință la lumina zilei.

Titrul serului de examinat este dat de cea mai mare diluție în care s-a produs o aglutinare de intensitatea ++ (50%).

S-a stabilit că pentru taurine, bubaline și cabaline, serul care conține cel puțin 100 U.A.I./ml să fie considerat pozitiv (deci la diluția de 1/100, aglutinări notabile cu ++, +++ și ++++); serul care conține între 30 și 100 U.A.I./ml să fie considerat dubios (deci la diluția 1/25 aglutinări notabile cu +++, ++++, la diluția de 1/50 aglutinări notabile cu +, ++ și +++, iar la diluția de 1/100, aglutinare notabilă cu +), iar serul cu mai puțin de 30 U.A.I./ml să fie considerat negativ (la diluția de 1/25 aglutinări notabile cu —, + și ++).

La porcine, ovine și caprine, serul conținînd cel puțin 50 U.A.I./ml este considerat pozitiv (la diluția de 1/50 aglutinări notabile cu ++,

+++, ++++ şi mai sus); serul conţinînd între 25 şi 50 U.A.I./ml este considerat dubios (la diluţia de 1/25 aglutinări notabile cu ++, +++, ++++, la diluţia 1/50 aglutinare notabilă cu +), iar serul conţinînd sub 25 U.A.I./ml este considerat negativ (la diluţia de 1/25, reacţii notabile cu — şi +). Valorile de convertibilitate a titrurilor aglutinante în titruri de unităţi internaţionale sînt următoarele:

1/25 + = 21 U.A.I./ml
1/25 ++ = 25 U.A.I./ml
1/25 +++ = 30 U.A.I./ml
1/25 ++++ = 36 U.A.I./ml
1/50 + = 42 U.A.I./ml
1/50 ++ = 50 U.A.I./ml
1/50 +++ = 60 U.A.I./ml
1/50 ++++ = 72 U.A.I./ml
1/100 + = 84 U.A.I./ml
1/100 ++ = 100 U.A.I./ml
1/100 +++ = 120 U.A.I./ml
1/100 ++++ = 144 U.A.I./ml

Pentru persoanele cu experienţă, aprecierea intensităţii aglutinării se poate face cu uşurinţă vizual, dar se poate recurge şi la compararea cu un set de eprubete conţinînd soluţie fiziologică şi suspensie de antigen (tabelul 3).

Tabelul 3

Aprecierea intensităţii aglutinării

Numărul eprubetei	Soluţie fiziologică (ml)	Suspensie de antigen (ml)	Intensitatea transparenţei
1	2	0	++++
2	1,5	0,5	+++
3	1	1	++
4	0,5	1,5	+
5	—	2	—

Pentru a fi exclusă o eventuală eroare de lucru şi spre a se putea aprecia şi absenţa unor aglutinări nespecifice, probele la care s-au obţinut aglutinări se supun retestării. Examinarea se repetă după aceeaşi tehnică, concomitent cu unul din următoarele teste:

a) inactivarea serului la 56—58°C timp de 30 minute şi efectuarea reacţiei ca la 37°C;

b) executarea reacţiei după tehnica obişnuită şi incubaţia la baie la 56°C timp de 18 ore.

Rezultatul aglutinării la probele repetate va fi dat după citirea şi compararea rezultatelor din stativul cu reacţia executată în mod obişnuit

şi una din variantele expuse. În situaţia că se observă o scădere a titrurilor prin reacţia-variantă, vor fi înregistrate acestea.

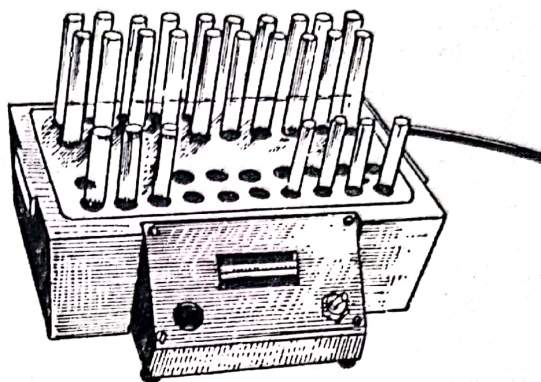


Fig. 48 — Tip de baie marină electrică pentru reacţii de scurtă durată

În cazul unor seruri provenite din efective bine cunoscute anterior ca indemne de bruceloză, la care s-au obţinut reacţii pozitive sau dubioase, acestea vor putea fi păstrate la temperatura de + 4°C şi repetate prin RAL după 4—5 zile, pentru verificarea menţinerii sau dispariţiei titrului aglutinant.

Toate probele care au dat aglutinări pozitive sau dubioase, indiferent de provenienţa lor (efective cunoscute sau nu ca indemne) se vor examina şi prin RFC.

Dacă se doreşte alcătuirea unui alt tip de scară a diluţiilor (de exemplu 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 etc.), se va proceda astfel: în prima eprubetă se pun 1,8 ml ser fiziologic, iar în următoarele (în număr variabil, în funcţie de titrul pînă la care se doreşte examinarea) cîte 1 ml ser fiziologic. În prima eprubetă se adaugă, 0,2 ml din serul suspect, realizîndu-se diluţia de 1/10, iar după omogenizare, se trece 1 ml în următoarea şi aşa mai departe.

Trebuie specificat că unele seruri, în concentraţii mari, pot avea o acţiune aglutinantă nespecifică, datorită unor proteine serice. În acest caz, în interpretarea reacţiei nu se iau în considerare primele titruri, în care serul este încă în concentraţie mare. Pentru o interpretare corectă, în acest caz se va lucra cu serii incluzînd diluţii mai mari decît cele obişnuite.

Un alt fenomen, care poate crea dificultăţi în interpretarea reacţiei de seroaglutinare este aşa-numitul fenomen de zonă. În acest caz se

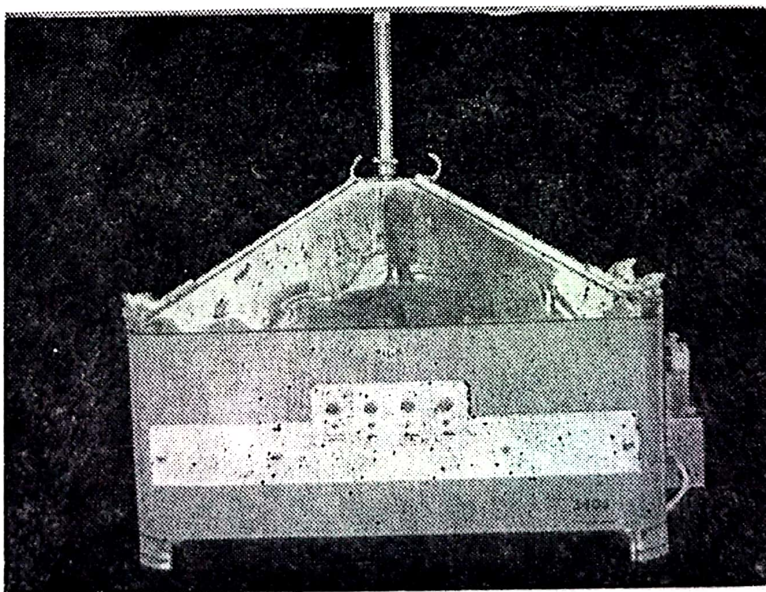


Fig. 49 — Baie de inactivare tip I.T.M.

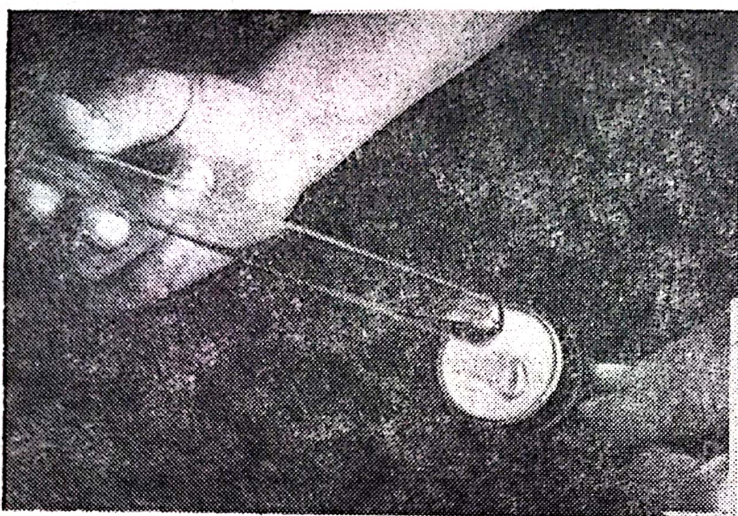


Fig. 50 — Citirea reacţiei de aglutinare cu ajutorul oglinzii de microscop

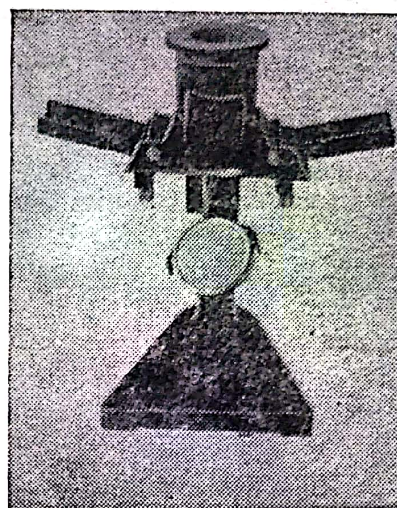


Fig. 51 — Aglutinoscop

constată că aglutinarea nu apare în toate tuburile seriei. Uneori aglutinarea nu apare în zona concentraţiilor mari de ser şi este puternică în zona concentraţiilor mici. Lipsa aglutinării în zona tuburilor cu concentraţii mari de ser a fost denumită fenomen de prezonă. Cînd lipsa aglutinării apare în zonă concentraţiilor mici de ser, fenomenul este numit postzonă.

Mecanismul fenomenului nu este încă pe deplin elucidat. După unele cercetări el ar fi determinat de absorbţia de către bacterii a unei globuline serice care învelind ca o peliculă bacteriile stînjeneşte acţiunea aglutinantă a anticorpilor specifici.

Reacţia de seroaglutinare lentă este folosită şi în diagnosticul tifopulurozei la păsări, al salmonelozelor la mamifere, în infecţiile colibacilare la mamifere şi păsări, în bronşita infecţioasă la păsări, în micoplasmoza păsărilor etc.

D) *Aglutinarea pasivă sau indirectă* este o reacţie antigen-anticorp, în care anticorpul aglutinează antigenul adsorbit pe diverse substraturi (colodiu, coloranţi insolubili sau bacterii pentru unele virusuri). În ultimul timp, se folosesc frecvent globulele roşii aparţinînd diferitelor specii de animale (mai ales cele de pasăre). Principiul reacţiei constă, într-un prim timp, în adsorbţia pe globulele roşii a antigenelor sau haptenelor şi al doilea timp în aglutinarea globulelor port-antigen de către seruri imune.

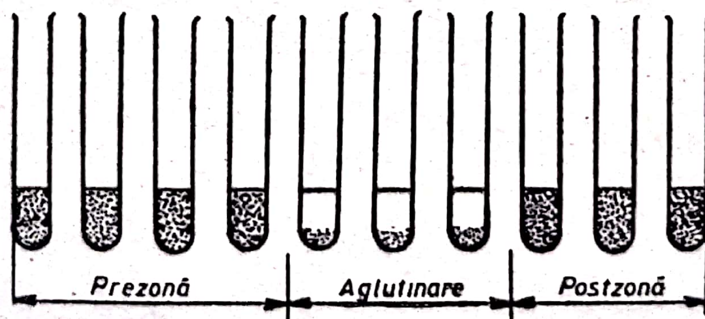


Fig. 52 — Fenomenul de zonă

S-a constatat că simplul contact cu globule roşii proaspete este suficient pentru fixare în cazul unor antigene polizaharidice, ca de pildă pentru *Haemophylus influenzae,* micobacterii, *Pasteurella tularensis, E. coli, Proteus.* Alte antigene însă, în special cele proteice, necesită în prealabil o tratare a globulelor roşii cu tanin, pentru ca adsorbţia antigenului pe suprafaţa acestora să se poată face în bune condiţii.

Această aglutinare poate fi inhibată de unele seruri, extracte de organe sau albumina de ou.

Adsorbţia aglutininelor. Serurile aglutinante specifice se prepară prin inoculări repetate, la iepuri, de suspensii de germeni faţă de care se urmăreşte obţinerea de anticorpi specifici. Structura bacteriilor este însă foarte complexă şi deseori se întîmplă să existe fracţiuni antigenice comune mai multor specii. De exemplu, *Salmonella pullorum* conţine antigeni notaţi convenţional cu IX, XII, iar *Salmonella abortus ovis* antigenii IV şi XII. Inoculîndu-se la iepure *S. pullorum,* în serul acestuia vor apărea anticorpi IX, XII. Datorită prezenţei anticorpului XII serul care rezultă va aglutina atît *S. pullorum* cît şi *S. abortus ovis.* El nu este deci specific.

Pentru a se obţine un ser care să aglutineze numai *S. pullorum,* se recurge la adsorbţia aglutininelor nespecifice (comune). În acest scop serul respectiv se pune în contact cu o suspensie de *S. abortus ovis,* care conţine antigenii IV şi XII. Amestecul se incubează la termostat timp de cîteva ore, interval în care se produce cuplarea anticorp-antigen. Anticorpul XII va neutraliza ca urmare, antigenul XII. Prin centrifugare, cuplul format se depune, iar în supernatant vor rămîne numai anticorpii IX, serul devenind în acest fel aglutinant numai faţă de antigenul IX al *S. pullorum.*

E) *Lactoaglutinarea sau reacţia inelară* este o metodă de diagnostic bazată pe decelarea anticorpilor specifici eliminaţi prin lapte. În cazul brucelozei, de exemplu, la animalele bolnave anticorpii trec şi la nivelul secreţiei lactate, în cazul localizărilor mamare, ei atingînd chiar titruri superioare serului sanguin. Antigenul brucelic, folosit în acest scop, este colorat (cu hematoxilină sau clorură de trifeniltetrazolium). Pentru reacţie se recoltează din toate sferturile glandei mamare (preferabil la mijlocul mulsorii, pentru a asigura o concentraţie medie de grăsime) cîte 5—6 ml lapte, se face o probă de amestec şi din aceasta se pune într-un tub de reacţie cantitatea de 1 ml, peste care se adaugă o picătură de antigen colorat. Se omogenizează cu grija de a nu se produce spumă şi se pune la termostat la 37°C timp de o oră (sau se lasă la temperatura camerei 3—4 ore), după care se face interpretarea reacţiei. În cazul în care în laptele de cercetat se găsesc anticorpi antibrucelici, se produce cuplul antigen anticorp, care prin modificarea încărcăturii sale electrice, va adera la particulele de grăsime din lapte şi va fi antrenat spre suprafaţă, imprimînd inelului de smîntînă ce se formează, culoarea antigenului. Reacţia este pozitivă cînd inelul superficial este colorat intens şi net, în timp ce restul lichidului se decolorează sau mai păstrează doar o uşoară nuanţă de colorare. Se consideră că reacţia este dubioasă, cînd inelul este mai colorat, iar coloana de lapte are aproximativ aceeaşi intensitate de culoare. Reacţia este negativă, cînd inelul este alb sau foarte slab colorat, iar coloana de lapte este intens şi uniform colorată. Nu se pretează pentru această reacţie laptele colostral, laptele de la vaci cu afecţiuni mamare

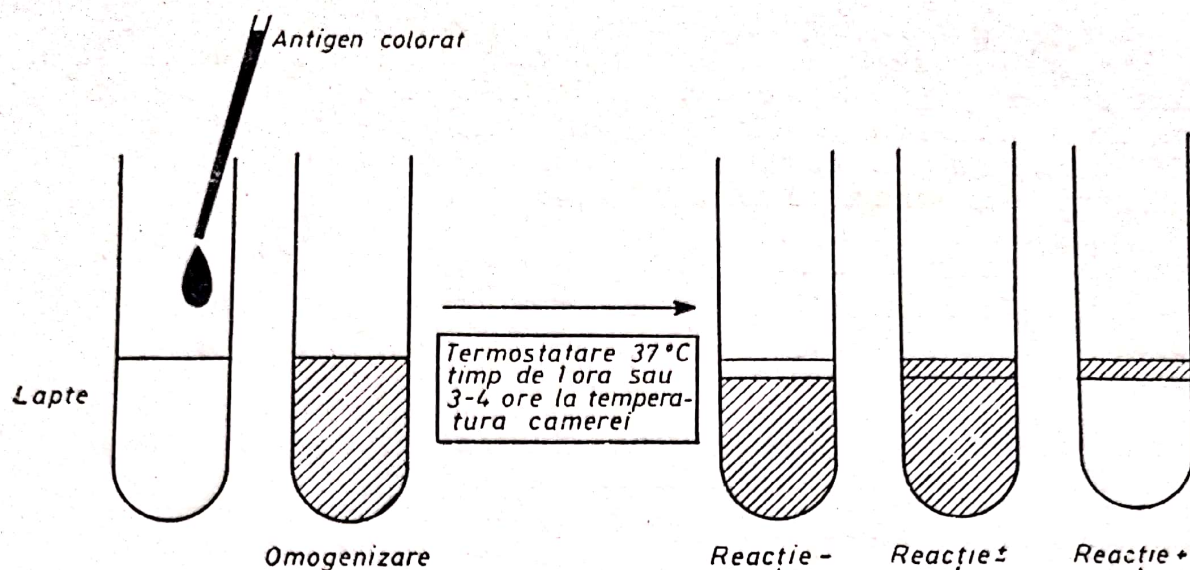


Fig. 53 — Schema reacției inelare de lactoaglutinare

laptele vechi cu un grad de acidifiere și laptele fiert. Rezultatele acestei metode nu concordă întotdeauna cu cele furnizate de RAL și RFC.

F) *Mucoaglutinarea* folosește ca sursă de anticorpi diferite mucozități (secreții genitale, nazale, oculare) ce se pun în contact cu antigenul adecvat. Aceste secreții se recoltează cu pipete sterile sau cu tampoane de vată și se diluează cu ser fiziologic steril, după care se lasă 24 de ore la 37°C pentru extracție. Apoi se pun în contact cu antigenul, întocmai ca la seroaglutinarea lentă. Reacția se poate practica în bruceloza sau vibrioza genitală a taurinelor, avînd însă mai mult o valoare orientativă.

G) *Reacția de microaglutinare-liză (RMAL)* este o metodă consacrată pentru diagnosticul infecției leptospirice. Ea se bazează pe punerea în contact a leptospirelor vii, cultivate pe mediu lichid (Korthoff), cu serul suspect. În prezența anticorpilor specifici antileptospirici se produce aglutinarea leptospirelor și, în final, liza acestora, fenomen vizibil prin examinare la microscop în cîmp întunecat. Metoda are avantajul că odată cu precizarea diagnosticului se poate stabili și tipul de leptospiră în cauză. În acest scop se folosesc tulpinile de leptospire mai frecvent izolate de la animale (*L. ichtero-hemorrhagiae, canicola, pomona, grippotiphosa, mitis, wolffii, sejroe, hebdomadis* etc.). Culturile ce se folosesc pentru această reacție trebuie să fie tinere de 5—12 zile și să conțină un număr suficient de leptospire pe unitatea de volum (50—300 leptospire pe cm^2, la obiectivul 20, ocular 15). Înainte de executarea reacției, tulpinile se verifică sub raportul aglutinabilității spontane (cu ser fiziologic) și specifice (cu ser specific). Reacția se execută pe lame de microscop bine degresate, pe care se pun atîtea picături din serul de cercetat (în diluții superioare celei de 1/50), cîte serotipuri de leptospire se folosesc. La fiecare picătură de ser se adaugă o picătură de cultură de leptospire din fiecare tip. În felul acesta, diluția serului pe lamă se dublează. Se omogenizează bine cu ansa flambată după fiecare picătură, se lasă în contact timp de 15 minute și se examinează la microscopul cu cîmp întunecat.

Aglutinarea se manifestă prin îngrămădirea leptospirelor în gheme cu aspect stelat, mobile datorită extremităților libere ce continuă să se

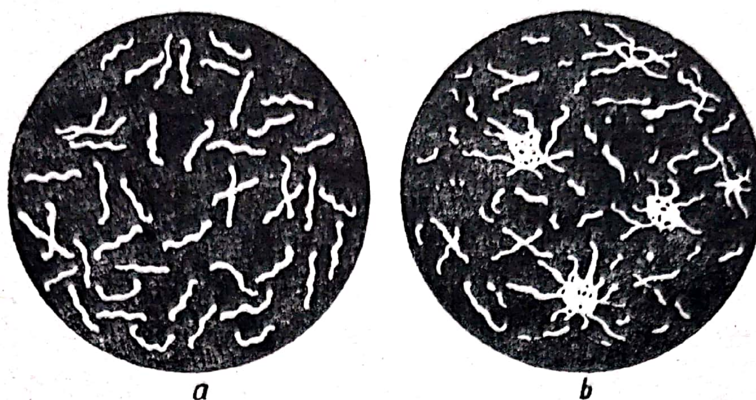


Fig. 54 — Reacţia de microaglutinare-liză
a — reacţie negativă; *b* — reacţie pozitivă

mişte. Fenomenul este urmat de imobilizarea treptată a leptospirelor, de ştergerea conturului şi de apariţia aspectului granular al leptospirelor, mergînd pînă la dezagregarea completă, cu dispariţia totală a leptospirelor din cîmpul microscopic.

În funcţie de concentraţia anticorpilor în sîngele de cercetat, rapiditatea cu care se instalează aglutinarea şi respectiv liza, precum şi intensitatea lor, reacţia apare vizibilă în mod variabil. La o concentraţie ridicată a anticorpilor se poate produce direct liza leptospirelor.

Interpretarea reacţiei se face astfel:

1 — se notează cu L liza totală a leptospirelor;

2 — reacţia intens pozitivă ++++ cînd aglutinarea este masivă constînd în gheme, fără leptospire libere;

3 — reacţia pozitivă +++ şi ++ cînd predomină ghemele, dar se văd şi leptospire libere;

4 — reacţia slab pozitivă + se observă 4—5 gheme pe cîmp, dar predomină leptospirele libere;

5 — reacţia negativă cînd nu există leptospire aglutinate.

Titrul de diagnostic pentru RMAL este considerat pozitiv la diluţia de 1/800 pentru cabaline şi de 1/400 pentru celelalte specii.

Reacţia de aglutinare-liză se poate efectua şi în tuburi, însă metoda este mai greoaie şi nu a luat extindere.

H) *Reacţia de fixare a complementului (RFC)* se foloseşte atît în diagnosticul unor bacterioze, cît şi al unor viroze şi a fost concepută ca urmare a constatării că cuplarea anticorpilor cu antigenele, datorită naturii antigenului, nu se manifestă întotdeauna într-o formă vizibilă sau, chiar dacă se manifestă, datele furnizate de RFC în asemenea cazuri sînt mai concludente. Apoi există o serie de specii bacteriene care, în forma lor virulentă, se prezintă sub formă de colonii de tip R, care aglutinează spontan şi deci nu pot fi folosite pentru reacţiile de aglutinare.

Principiul reacţiei se bazează pe constatarea că ori de cîte ori combinarea antigenului cu anticorpul specific se petrece în prezenţa alexinei (complementului), aceasta se fixează pe complexul format. În consecinţă, dacă se pune în evidenţă fixarea complementului, se dovedeşte dispariţia lui din amestec ca entitate liberă şi, indirect, combinarea antigenului cu anticorpul specific. Dar, pentru a face vizibil acest lucru, se recurge la un artificiu de tehnică serologică, care constă în introducerea în reacţie a

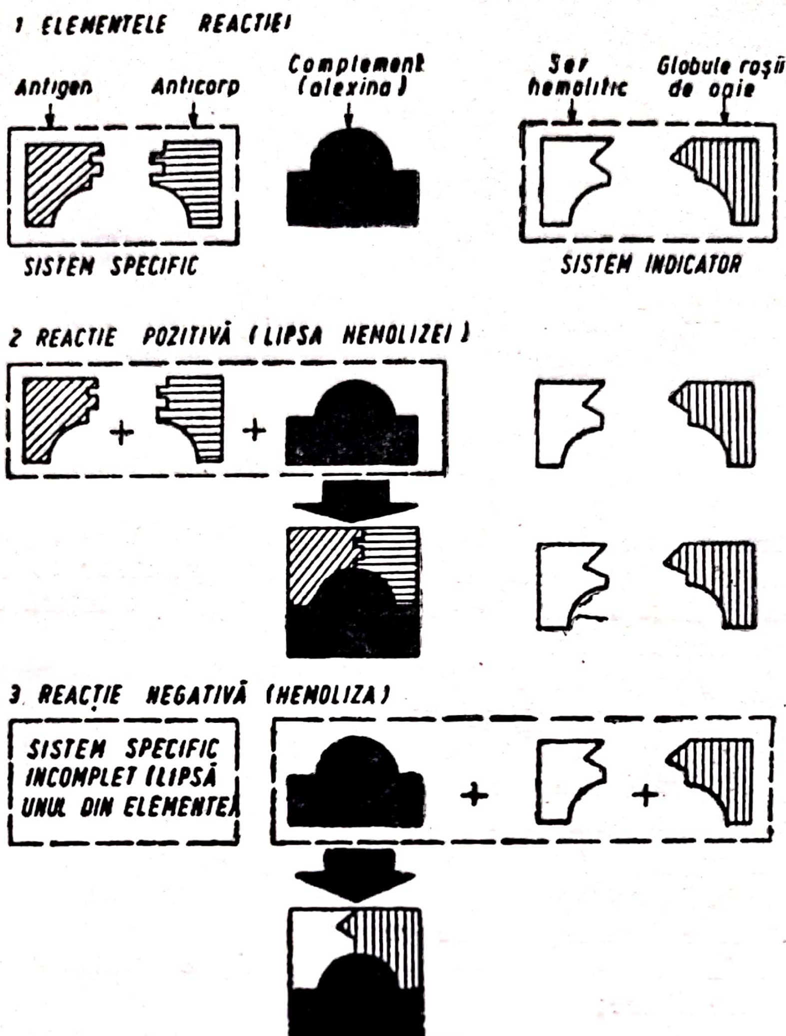


Fig. 55 — Schema reacției de fixare a complementului

unui al doilea sistem antigen-anticorp, cu rol de sistem indicator. Acest sistem este reprezentat de globulele roșii de oaie și de serul hemolitic antioaie.

În prezența alexinei, hematiile de oaie combinate cu anticorpii antioaie prezintă o modificare vizibilă — hemoliza. În absența alexinei, hematiile, deși amestecate cu serul hemolitic, rămîn nehemolizate.

Schematic, elementele RFC sînt următoarele:

1 — *antigenul* — o suspensie microbiană, virală sau un antigen solubil (extracte microbiene, tisulare);

2 — *anticorpul* — reprezentat de serul provenit de la animalul bolnav, trecut prin boală sau imunizat artificial;

3 — *alexina* (complementul) — reprezentat de serul proaspăt de cobai; el poate fi livrat și în stare liofilizată, urmînd a fi diluat ex tempore;

4 — *suspensia de hematii de oaie*. Pentru a obține o suspensie de 1,25% hematii se recoltează sînge de oaie, într-un balon cu perle de sticlă, steril, pentru defibrinare; centrifugarea, la 2000 turații/minut timp de 15 minute, este urmată de resuspendarea hematiilor în ser fiziologic steril, de omogenizare și centrifugare; după 3 asemenea spălări se pre-

pară suspensia, în proporţie de 1,25 ml la 100 ml ser fiziologic, care se foloseşte în reacţie;

5 — *serul hemolitic antihematii de oaie* care se diluează în prealabil la titrul indicat de etichetă; el se prepară pe iepure prin inoculări repetate de suspensii de hematii de oaie.

Reacţia fiind foarte sensibilă, elementele ei trebuie, în prealabil, titrate (antigen, alexină, ser hemolitic) pentru a folosi cantităţi bine determinate. Este de asemenea necesar să se folosească o serie de martori care să permită controlul reacţiei şi să evite greşelile de interpretare datorită alterării accidentale a unuia din elemente (martor pozitiv, martor negativ, martor pentru stabilirea valorii anticomplementare a serului de cercetat, a antigenului).

RFC se foloseşte în mod curent pentru diagnosticul morvei, durinei, brucelozei, infecţiilor rickettsiene, chlamidiene, paratuberculozei, epididimitei infecţioase a berbecilor etc.

Spre exemplificare este dată tehnica RFC în cazul brucelozei.

Elementele reacţiei. Antigenul folosit în RFC este acelaşi ca şi cel de la tehnica RAL, cu titrul pentru RFC indicat în prospectul însoţitor sau care rezultă la titrarea în laborator. Dacă se consideră necesar, se poate face o retitrare a antigenului la fiecare serie nou-primită în laborator.

Serurile de examinat trebuie să fie limpezi; se pot admite uşoare urme de hemoliză.

Serul fiziologic este o soluţie de clorură de sodiu chimic pură 8,5‰ preparată în apă distilată. Toate operaţiunile din aceeaşi zi se vor efectua cu o singură serie de ser fiziologic.

Alexina de lucru este cea livrată de ICVB „Pasteur" sau proaspăt recoltată de la cobai. Hematiile pentru sistemul hemolitic se recoltează de la berbec şi se pregătesc prin centrifugare şi spălare de 3—4 ori cu ser fiziologic astfel ca la ultima centrifugare supernatantul să rămînă complet limpede.

Serul hemolitic se procură de la ICVB „Pasteur" şi se foloseşte conform instrucţiunilor şi la titrul specificat pe eticheta fiolei sau determinat prin titrare.

Executarea reacţiei. Serul de examinat se distribuie în eprubete de 100/12 mm, în cantitate de 0,1 ml, la care se adaugă 0,4 ml ser fiziologic. Stativele se agită şi se trec la baia de inactivare de + 56°C unde se ţin 30 de minute. După inactivare se adaugă în fiecare eprubetă antigenul în doza de lucru stabilită prin titrul dat de biofabrică sau retitrarea de laborator, care se aduce la volumul de 0,5 ml ser fiziologic. Se agită. Se adaugă apoi alexina în doza stabilită prin titrare, de asemenea întregită la volumul de 0,5 ml de probă. Se agită. Stativele se introduc în baia de 37°C unde se ţin 30 de minute. Se scot de la baie şi se adaugă cîte 1 ml din sistemul hemolitic, în fiecare eprubetă. Se agită. Se reintroduc la baia de 37°C timp de 15 minute după care se citeşte imediat rezultatul.

Pentru controlul reacţiei şi al calităţii elementelor, concomitent se vor introduce şi martori de ser pozitiv şi ser negativ.

Citirea constă în aprecierea gradului de hemoliză, notîndu-se astfel:

1 — reacţie intens pozitivă (++++), exprimată prin reţinerea totală a hemolizei;

2 — reacţie pozitivă (+++), exprimată prin reţinerea aproape totală a hemolizei;
3 — reacţie dubioasă (++), hemoliză parţială, 50%;
4 — reacitẹ dubioasă (+), hemoliză aproape completă;
5 — reacţie negativă (—), hemoliză totală.

Interpretarea reacţiei. Se consideră pozitive probele notate cu +++ şi ++++.

Se consideră dubioase probele notate cu + şi ++.

Se consideră negative probele notate cu —.

Toate probele dubioase şi pozitive se vor reexamina cu aceeaşi tehnică dar şi în prezenţa martorului de probă (fără antigen), dacă aceasta nu s-a făcut la primul examen.

Titrarea elementelor de reacţie. *Titrarea antigenului* se face după schema arătată în tabelul 4, în scopul stabilirii valorii fixatorii şi a puterii anticomplementare.

Tabelul 4

Titrarea antigenului pentru RFC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Martor sist. hem. cu alex.	Martor sist. fără alex.
Ser pozitiv	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		
Ser fiziologic	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4		
Inactivare 30 minute la +56°C												
Antigen din flac. dil. 1/50	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1		
Alexină (titr. stab.) adus la volum	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Ser fiziologic	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0	1	1,5
Se trece la baia de 37°C 30 de minute												
Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15 minute la 37°C												

Pentru stabilirea puterii anticomplementare a antigenului se va executa aceeaşi reacţie înlocuind serul pozitiv cu serul negativ.

Valoarea fixatorie a antigenului este dată de eprubeta care conţine cantitatea minimă de antigen ce fixează de ++++, şi care faţă de serul negativ s-a dovedit fără putere anticomplementară.

Titrarea alexinei se face în prezenţa tuturor elementelor ce intră în reacţie (tabelul 5).

Tabelul 5

Titrarea alexinei pentru RFC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mart. sist. hem.
Ser negativ de specie	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Ser fiziologic	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Inactivare la +56°C timp de 30 minute											
Alexină diluată 1/10	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	—
Antigen în doză de lucru	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	—
Ser fiziologic	0,40	0,38	0,36	0,34	0,32	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	1,5
Se trece la baia de 37°C timp de 30 minute											
Sistem hemolitic	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Baie de 37°C timp de 15 minute											
Citirea reacției											

Titrul este dat de eprubeta în care s-a obținut hemoliza totală cu cea mai mică doză de alexină și reprezintă doza de lucru în reacția ce se face la probele de examinat.

Alexina liofilizată se folosește pentru lucru astfel:

Se estimează aproximativ numărul de fiole necesare pentru probele din ziua respectivă. Se suspensionează conținutul fiecărei fiole cu 1 ml de apă distilată, al căror volum apoi se comasează și se omogenizează. Din acesta se constituie pentru titrare o suspensie inițială de 1 : 10 în ser fiziologic, pornindu-se cu 0,1 ml și în volume crescînde cu pasul de 0,02 ml (ca în exemplul din tabelul 5).

Pentru alexina proaspăt recoltată de la cobai întreținuți corespunzător, suspensia de titrare va fi de 1 : 20, cu pasul de 0,03 ml.

Numărul de eprubete din scară, mărimea pasului (0,03 ml; 0,02 ml; 0,01 ml) și suspensia inițială (1 : 20; 1 : 10) se apreciază în funcție de calitatea alexinei din titrările anterioare. Serul de specie, ce se folosește în titrarea alexinei, se obține din amestecul unui număr de 5—10 seruri negative proaspete, păstrat la frigider spre utilizare 3—4 zile.

Titrarea serului hemolitic se face după următoarea schemă arătată în tabelul 6.

Titrarea serului hemolitic pentru RFC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ser hemol. în dil.	1/100 1	1/500 1	1/1000 1	1/1500 1	1/2000 1	1/2500 1	1/3000 1	1/3500 1	1/4000 1
Hem. oaie susp. 2,5%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser fiz.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
La baia de 37°C timp de 30 minute									
Alexină dil. 1/10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
La baia de 37°C timp de 15 minute									
Citirea rezultatelor									

Titrul serului hemolitic este indicat de diluţia maximă la care se obţine hemoliza totală.

La prepararea sistemului hemolitic pentru reacţie se va folosi de 4 ori cantitatea stabilită la titrare (4 unităţi hemolitice).

Sistemul hemolitic. Se prepară dintr-o suspensie de hematii de berbec spălate prin centrifugare. Volumul de ser fiziologic necesar pentru sistemul hemolitic se împarte în două părţi egale. Se calculează cantitatea de ser hemolitic necesară, care se adaugă la una din părţi. La cealaltă se adaugă hematiile spălate, calculate 1,25% pentru întreaga cantitate de sistem.

După agitare se amestecă cele două părţi.

Se agită din nou şi apoi se introduce la baie la 37°C, timp de 30 minute, păstrîndu-se apoi la frigider pînă la folosire.

În aplicarea RFC, trebuie să se ţină seama de un fenomen adesea întîlnit — anticomplementaritatea pe care o posedă unele antigene sau seruri. Prin anticomplementaritate sau putere anticomplementară se înţelege proprietatea pe care o au acestea, de a fixa alexina, în absenţa cuplului antigen-anticorp. Acest inconvenient poate fi înlăturat uneori prin diluare sau prin tratare prealabilă cu diferite substanţe chimice. Astfel antigenele pot fi tratate cu eter, cloroform, acetonă, sau pot fi congelate repetat.

Antigenele sau serurile cu proprietăţii anticomplementare, împiedicînd hemoliza la un titru egal sau apropiat de titrul fixator, nu pot fi întrebuinţate în reacţie. Pentru a titra puterea anticomplementară, se execută reacţia în aceleaşi condiţii, cu singura deosebire că serul pozitiv se înlocuieşte cu diluant.

RFC se mai poate efectua şi după alte tehnici. Una din acestea este şi RFC la rece. În aceasta, fixarea alexinei pe sistemul antigen-anticorp are loc la +4°C. În aceste condiţii pentru fixarea alexinei este nevoie de un timp mai îndelungat (18 ore). Metoda s-a dovedit a fi mai sensibilă

în decelarea anticorpilor fixatori în cazul unor infecţii bacteriene, cum este tuberculoza, sau în bolile virale.

RFC indirectă, sau reacţia de inhibare a fixării complementului, se practică pentru serurile unor specii de păsări (găini, raţe) în care apar, în cazul unor infecţii, anticorpi capabili să inhibe fixarea alexinei pe complexul antigen-anticorp. În acest caz se adaugă în reacţie un ser cunoscut pozitiv care, împreună cu antigenul, fixează alexina (ser indicator), dar care, în prezenţa anticorpilor inhibitori este neutralizat, antigenul rămînînd liber. Alexina fiind fixată pe sistemul hemolitic are loc hemoliza, deci existenţa acesteia indică o reacţie pozitivă.

Dacă în serul examinat nu există anticorpi inhibanţi, serul indicator se fixează pe antigen formînd cuplul specific, care fixează alexina şi, ca urmare, hemoliza nu se mai produce. Absenţa hemolizei în acest caz indică o reacţie negativă.

I) *Reacţia de conglutinare.* Principiul reacţiei a fost enunţat încă în 1906 de către BORDET, care a arătat existenţa în serul bovinelor a unui factor termostabil la 56°C capabil de a aglomera hematiile în prezenţa alexinei libere. Ea are avantajul că este mai sensibilă decît reacţia de fixare a complementului.

Elementele reacţiei sînt:
— alexină de cal (ser, eventual liofilizat);
— conglutinina (ser de bovine adulte, inactivat 30 de minute la 56°C; conservarea se face în stare congelată la —30°C);
— globule roşii de oaie (suspensie de hematii spălate de 4 ori în soluţie fiziologică tamponată, la concentraţie finală de 0,5%);
— reactivi specifici (serul de cercetat şi suspensia de antigen corespunzătoare);
— probele martor (ser pozitiv şi suspensia antigenică).

Reacţia se poate desfăşura în tuburi sau în plăci de material plastic (în cazul aplicării micrometodei). În cele ce urmează va fi descrisă micrometoda pentru diagnosticul mixomatozei iepurilor.

1 — *Prepararea serurilor de referinţă* se face pe iepuri adulţi, prealabil controlaţi serologic şi reacţionaţi negativ. Virusurile mixomatozei

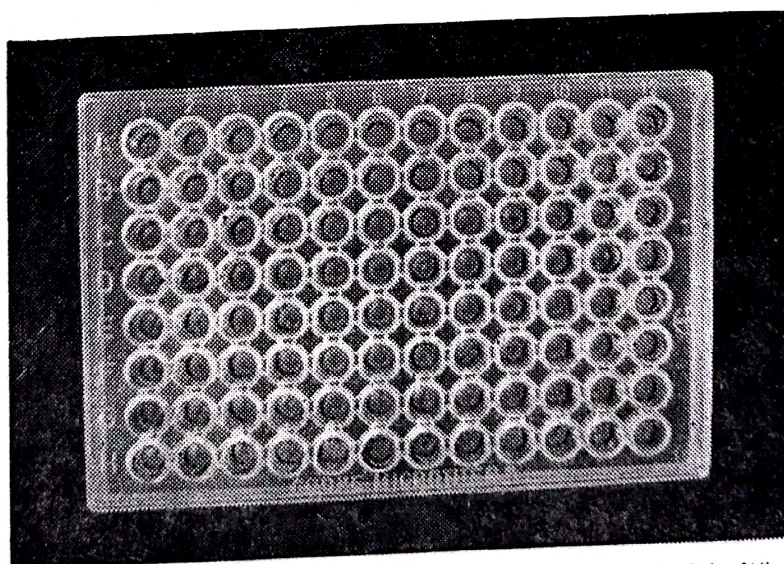


Fig. 56 — Placă de material plastic cu godeuri folosită în microreacţii serologice

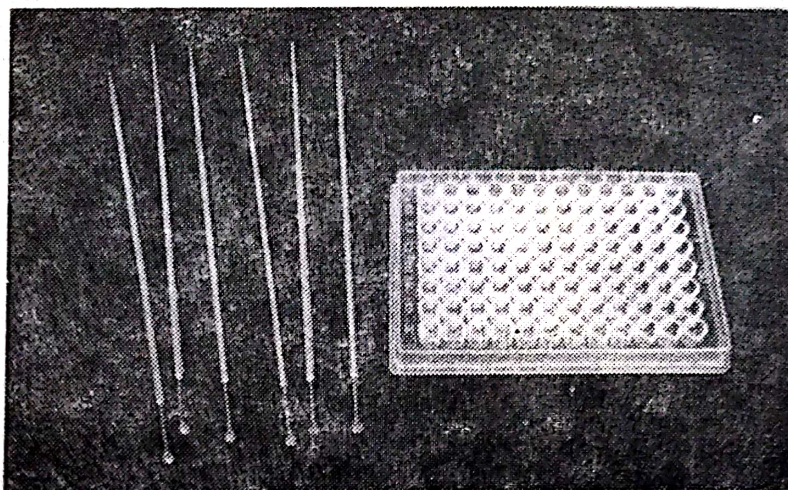


Fig. 57 — Placă cu godeuri și omogenizatoare folosite la microreacții serologice

și ale fibromatozei folosite pentru inocularea iepurilor donatori de ser pozitiv sînt extrase din mixoame și fibroame dezvoltate la iepuri după inocularea intradermică a acestor virusuri.

a) Serul antimixomatos. Mai mulți iepuri sînt inoculați mai întîi pe cale subcutanată cu virusul fibromatozei (vaccinare), iar după 2—3 săptămîni sînt inoculați de probă cu virusul mixomatozei. În cursul acestei probe, fiecare animal vaccinat, ca și martorii, primesc pe cale intradermică 10^3DL_{50} din virusul mixomatozei, doză care omoară invariabil martorii în decurs de 10 zile. După 3 săptămîni, iepurii inoculați sînt hiperimunizați prin 3—4 reprize, la intervale de 1 săptămînă, cu cca 10^8DL_{50} de virus al mixomatozei, inoculat pe cale subcutanată sau intradermică, în mai multe puncte diferite ale suprafeței cutanate. La o săptămînă după ultima inoculare, sîngele este prelevat prin puncție cardiacă, după o prealabilă dietă absolută de 24 de ore.

b) Serul antifibromatos. Ca și în cazul precedent, iepurii primesc mai întîi virus fibromatos pe cale intradermică. După 20—30 de zile, cînd fibromul inițial a regresat vizibil, sau a dispărut, acești iepuri sînt reinoculați în 3 reprize, la un interval de o săptămînă, cu 10^9DL_{50} de virus fibromatos injectat pe cale intradermică în mai multe puncte.

Sîngele iepurilor este prelevat la o săptămînă de la ultima inoculare, prin puncție cardiacă.

Probele de ser, recoltate de la iepuri astfel hiperimunizați, sînt decantate, după coagularea sîngelui, centrifugate și repartizate în fiole sau eprubete, în cantități reduse, pentru a nu fi necesare congelarea și decongelarea repetată. Serurile se conservă la —30°C și, în momentul folosirii, se inactivează 30 de minute la 56°C.

2 — *Prepararea antigenului* se poate realiza din mixoame și respectiv fibroame cutanate, dezvoltate la iepuri inoculați experimental sau din culturi celulare renale de iepuri, inoculate cu aceleași virusuri. Această din urmă soluție este mai convenabilă din toate punctele de vedere. Antigenul este reprezentat de lichidul de cultură și monostratul celular inoculat, recoltate la 6—7 zile de la inocularea cu doze de 10^{-3} virus.

Păstrarea se face la —70°C după repartizarea în fiole sau eprubete, în cantități mici, pentru a evita decongelările și congelările repetate.

În momentul utilizării, suspensia se decongelează și se filtrează prin filtru millipore.

3 — *Titrarea conglutininei și a alexinei* are menirea de a determina concentrația cea mai slabă de conglutinine și alexină, capabile de a provoca un efect conglutinant total (1 unitate conglutinantă). Titrarea se face printr-o reacție de conglutinare încrucișată pentru fiecare șarjă de conglutinine și alexină. În acest scop, se pune în contact serul de bovine adulte inactivat în diluții crescînde (0,025 ml) cu globulele roșii de oaie stabilizate 0,5% (0,05 ml) și cu alexina (0,025 ml) în diluții crescînde. De exemplu, dacă se alege concentrația de conglutinine cu care să se lucreze, la 8,75%, diluția de alexină corespunzătoare, în care se produce un efect conglutinant total este de 1/64, ceea ce reprezintă, în cazul de față, o unitate conglutinantă.

În reacția propriu-zisă se vor folosi întotdeauna 2 unități conglutinante. În exemplul de mai sus, alexina va fi deci utilizată în concentrația de 1/32.

4 — *Titrarea antigenului și anticorpilor.* Diluțiile de lucru ale reactivilor generali (conglutininele și alexina) fiind determinate, se recurge la titrarea antigenului și anticorpilor. Se pun în contact cantități constante din antigen (virus mixomatos) în diluții crescînde, cu aceleași cantități de anticorpi (ser de iepuri hiperimunizați) de asemenea în diluții, plus suspensii de hematii de oaie 0,5% și, după 30 de minute de incubație la 37°C, reacția se interpretează prin aprecierea gradului de conglutinare.

Desfășurarea reacției propriu-zise are loc după schema arătată în tabelul 7.

Tabelul 7

Desfășurarea reacției de conglutinare

Elementele reacției	Diluția		Martor ser		Martori generali	
	1/10	1/20	1/10	1/20	Antigen	Alexină
1 — Absorbția complementului						
Ser suspect	0,025	0,025	0,025	0,025	0	0
Antigen în concentrație optimală	0,025	0,025	0	0	0,025	0
Soluție tampon	0	0	0,025	0,025	0,025	0,025
Alexină titrată	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
30 minute la 37°C						
2 — Conglutinarea						
Volum de globule roșii de oaie și conglutinină titrată	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
30 minute la 37°C						
3 — Centrifugarea la 500 turații/minut timp de 15 minute						

J) *Reacţiile de precipitare* se folosesc atunci cînd antigenul este reprezentat de soluţii coloidale (antigen molecular), formate din particule foarte fine, care, sub acţiunea anticorpilor, (precipitinelor) ies din soluţie sub forma unui precipitat. Ele sînt rezultatul acţiunii anticorpilor specifici dintr-un ser imun (în prezenţa electroliţilor) asupra substanţei precipitabile (antigenul). Fenomenul precipitării se aseamănă, în linii mari, cu acela al aglutinării, pentru că în ambele se produce o îngrămădire sub formă de flocoane a particulelor răspîndite în soluţia de electrolit cu amestec de antigen-anticorp. Aceste reacţii au o mare sensibilitate şi pot pune în evidenţă cantităţi infime de antigen prezent în soluţie (cu seruri imune de calitate bună se pot decela antigene în diluţie de chiar 1/1 milion). Aceasta se recomandă şi pentru identificarea diverselor proteine animale, în decelarea unor adaosuri de natură proteică la produsele alimentare. Se foloseşte însă curent şi pentru identificarea unor antigene bacteriene, cum ar fi cele ale *B. anthracis,* ale streptococilor.

Dintre tehnicile de evidenţiere a reacţiei de precipitare, în practică se folosesc mai ales cîteva:

a) *Precipitarea în disc* în care lichidele conţinînd anticorpii şi antigenul sînt puse în contact de aşa manieră încît, să nu se amestece, iar la nivelul de separare a lor să apară un disc de precipitare, vizibil ca un strat albicios, ce contrastează cu ambele lichide. Procedeul stă la baza diagnosticului serologic al antraxului prin tehnica cunoscută sub denumirea de reacţia Ascoli. Elementele reacţiei sînt:

— *antigenul* (precipitinogenul). Se taie cît mai mărunt fragmente de organe suspecte, de preferinţă din splină şi se suspendă în soluţie fiziologică în proporţie de 1/3. Se fierb timp de 10 minute în baia de apă şi se filtrează prin vată de azbest. Filtratul obţinut este un lichid perfect limpede, de culoare uşor gălbuie, reprezentînd precipitinogenul. În ultimul timp, se foloseşte extracţia precipitinogenului la rece, în soluţie fiziologică fenolată 0,5%;

— *serul anticarbonos precipitant* se prepară pe cabaline prin hiperimunizarea acestora cu cultură de *B. anthracis* administrată intravenos. Conţine anticorpi precipitanţi somatici şi capsulari.

Tehnica de lucru. Într-un tub de reacţie se introduc 0,5—1 ml extract de organe filtrat precipitinogen, antigen perfect limpede. Cu o pipetă Pasteur bine efilată se adaugă la fundul tubului o cantitate egală de ser anticarbonos precipitant în aşa fel ca cele două lichide să nu se amestece. Serul precipitant rămîne la fundul tubului, în timp ce extractul de organe se ridică la suprafaţă.

Reacţia este pozitivă cînd la zona de contact dintre cele două lichide apare imediat sau în decurs de 2—3 minute un disc de culoare albă-cenuşie.

În cazul efectuării reacţiei Ascoli din piei de la cadavre suspecte de antrax, extracţia precipitinogenului se face de regulă prin macerare. Pielea se taie în fragmente mici, care se pun la macerat în soluţie fiziologică fenolată 5‰ timp de 24 de ore, după care se filtrează şi se execută reacţia în acelaşi mod (reacţia Ascoli la rece). Trebuie precizat că sărarea pieilor împiedică punerea diagnosticului prin această metodă.

b) *Precipitarea în amestec sau floculareа.* În acest caz, în amestecul dintre serul conţinînd anticorpi şi antigen, reacţia apare iniţial sub

forma unei ușoare opalescențe, care apoi se accentuează, apărînd vizibil ca niște flocoane mari, care sedimentează.

Această reacție este folosită pentru titrarea unor toxine bacteriene sau a unor seruri antitoxice (antitoxine). Viteza de producere a reacției depinde direct de raportul dintre antigen și anticorp în sensul că are loc cu atît mai repede cu cît concentrația de anticorpi din ser este mai corespunzătoare cantitativ antigenului. Un exces, fie din partea antigenului fie a anticorpilor, provoacă o întîrziere a reacției, care este cu atît mai mare cu cît disproporția este mai mare. Pe baza acestui principiu, se poate determina fie titrul serurilor antitoxice, folosind ca antigen o toxină cu titrul cunoscut, fie titrul unei toxine cu ajutorul unui ser antitoxic cu titru cunoscut.

Elementul cunoscut, de exemplu toxina, se repartizează în mai multe tuburi de reacție în cantitate constantă (1—2 ml), după care se adaugă același volum din diluții crescînde ale elementului necunoscut (în cazul de față serul antitoxic): 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 etc. Tuburile se agită și se lasă apoi în repaus urmărindu-se timpul de apariție a floculării. Se notează tubul în care reacția apare mai întîi, acesta reprezentînd diluția în care numărul de unități antitoxice corespunde numărului de unități toxice din volumul de toxină repartizat inițial în toate tuburile.

c) *Precipitarea în gel sau agar* este o metodă care, datorită fineței și preciziei rezultatelor ce le oferă, este azi larg folosită în laboratoare, în special în determinările legate de structura antigenică a microorganismelor, ca și în alte determinări de imunologie, imunochimie. Prin difuziunea lentă a soluțiilor de antigen și anticorp în agar, acrylamidă sau gelatină, se creează linii de precipitare vizibile, care permit stabilirea exactă a particularităților antigenice, ale diferitelor produse biologice sau a capacității precipitante a unor seruri. Metoda a fost inițiată de ELEK (1948) și OUCHTERLONY (1949).

Pentru a efectua asemenea reacții se procedează la turnarea pe plăci de sticlă dimensionate după dorință, în plăci Petri sau în plăci din mate-

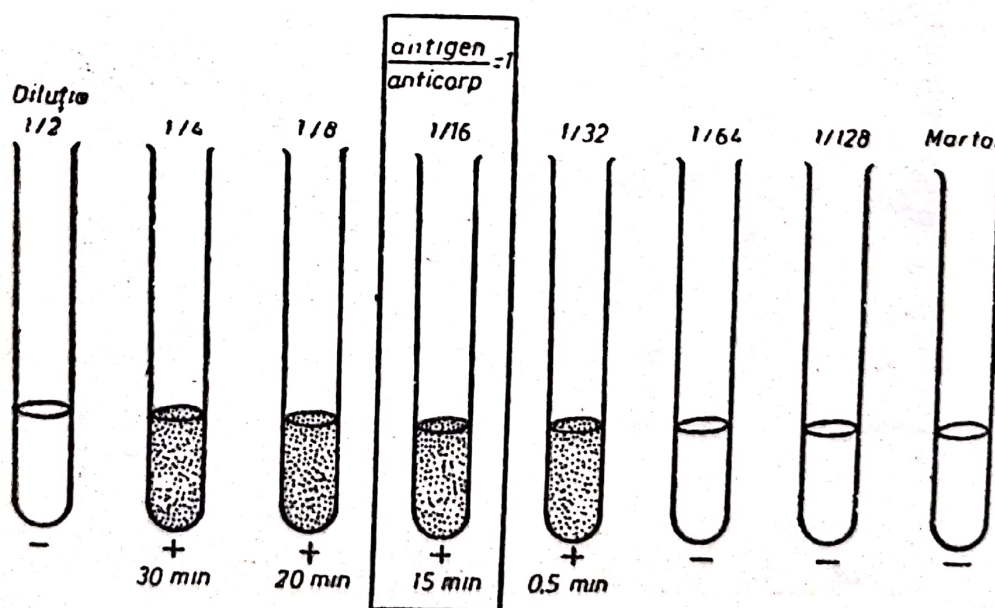


Fig. 58 — Schema reacției de serofloculare (după Valeria Bica Popii)

rial plastic, a unui strat de agar purificat 2,5—3% în soluție tamponată și mertiolată 1/10 000. Este necesar ca plăcile să aibă o poziție perfect orizontală (fapt realizabil cu ajutorul unei bule de nivel). Agarul topit se toarnă în cantitate suficientă, pentru ca stratul să aibă o grosime de 2,5—3 mm. După solidificare, pe acest strat se așază cîte o matriță, avînd forme și mărimi variabile (pentru godeuri rotunde sau pătrate, situate la distanțe variabile, de circa 6—12 mm), în funcție de tipul antigenului și de titrul serului folosit. Odată matrița așezată pe stratul de agar solidificat, se toarnă un nou strat de agar topit, după a cărui solidificare, prin ridicarea matriței, vor rezulta godeuri în care se vor pune componentele reacției. Cel mai frecvent, se folosește modalitatea de a amplasa în jurul unui godeu central godeuri de aceleași dimensiuni. Folosirea lor poate fi variabilă. Se poate pune central un ser cunoscut și în godeurile din jur antigene necunoscute, se poate pune central un antigen cunoscut și în jur seruri necunoscute, se poate pune central un ser necunoscut și în jur antigene cunoscute și invers. Indiferent de soluția practicată, se pun în godeurile respective serurile și respectiv antigenele care intră în reacție (cîte 1 sau 2 picături în diluții corespunzătoare), și plăcile se lasă la temperatura camerei. Eventual pe partea internă a capacului plăcii se pune o hîrtie de filtru îmbibată cu apă distilată, care întreține o umiditate corespunzătoare pînă la citirea reacției sau se realizează o cameră umedă special destinată acestui scop. În general, citirea se face din două în două zile, cea definitivă fiind în cea de a 6-a zi. În cazul că există antigene corespunzătoare anticorpilor din serurile folosite, între godeurile respective, la distanțe variabile, se formează linii de precipitare albe-cenușii, vizibile cu ochiul liber. Lungimea și grosimea lor este în funcție de titrul anticorpilor din ser și de calitatea mediului folosit. Aceste linii pot fi apoi colorate (cu amidoschwarz, sau cu alți coloranți preparați după formule diferite), după prealabila deshidratare a stratului de agar cu ajutorul hîrtiei de filtru. Spre exemplificare este dat *testul Coggins*

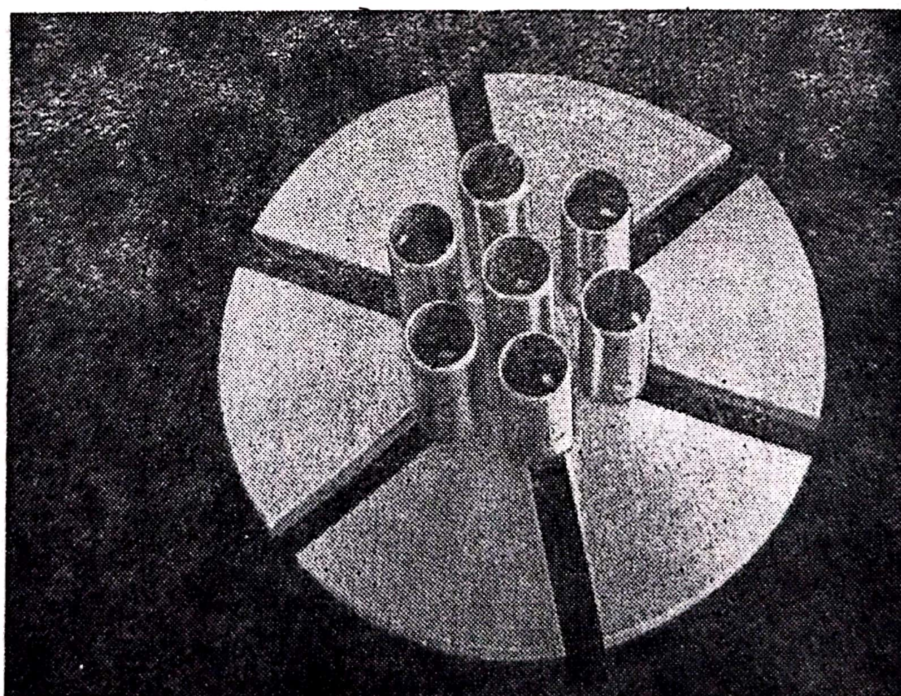


Fig. 59 — Dispozitiv reglabil original folosit pentru efectuarea godeurilor în agarul destinat reacțiilor de imunodifuziune în gel

de imunodifuziune în gel de agar pentru diagnosticul aneminei infecţioase a calului. Este la ora actuală, în afară de inocularea experimentală şi izolarea virusului pe culturi celulare, singura metodă specifică. Ea are avantajul că se poate practica în timpul vieţii animalului, că descoperă animalele anemolatente sau cu forme insuficient exprimate clinic. Nu dă rezultate înainte de formarea anticorpilor specifici (10—14 zile de la debut) sau în faza negativă imunologică.

Pentru efectuarea reacţiei se foloseşte un mediu cu agar în soluţie de tampon borat preparat astfel:

— NaOH — 2 g
— acid boric (H_3BO_3) — 9 g
— apă distilată — 1000 g

Ingredientele trebuie să fie de cea mai mare puritate, soluţia trebuie să aibă în final un pH de 8,6 (măsurat la pH-metru de precizie). Din aceasta se prepară apoi agar de două concentraţii, care determină densităţi diferite: 1,5% şi 0,7%, folosindu-se Agar Noble Difco sau Special Agar Noble Difco. Calitatea agarului este de asemenea de o extremă importanţă pentru reuşita reacţiei.

Agarul se toarnă în două straturi, în plăci de material plastic (pot fi folosite cutii pentru polivitamine sau alte drajeuri aflate în comerţ, cu condiţia să nu fie zgîriate şi să fie cît mai transparente), în aşa fel ca primul strat să aibă o grosime de cca 2 mm (2—2,5 ml agar 1,5%) iar al doilea de 3—3,5 mm (6,5 ml agar de concentraţie 0,7%). Plăcile respective, spălate şi uscate, se aşază în prealabil pe o suprafaţă plană, orizontalizată cu ajutorul unei bule de nivel. Repartizarea agarului topit se face cu ajutorul unor pipete curate. Se lasă să se solidifice primul strat de agar (cca 20—30 minute) după care se toarnă cel de al doilea strat şi se lasă să se solidifice. Apoi, cu ajutorul unei preducele avînd diametrul de 7 mm şi al unui şablon de material plastic sau ebonită, avînd orificii corespunzătoare godeurilor care vor rezulta în agar, se secţionează primul strat (se simte după consistenţă atingerea celui de al doilea strat); cu ajutorul unui tub de material plastic cu dimensiunea exterioară de 7 mm, se aspiră rondelele de agar rezultate. Se poate folosi şi un dispozitiv prevăzut cu o preducea centrală şi 6 preducele periferice, situate la o distanţă exactă de 3 mm de cel central.

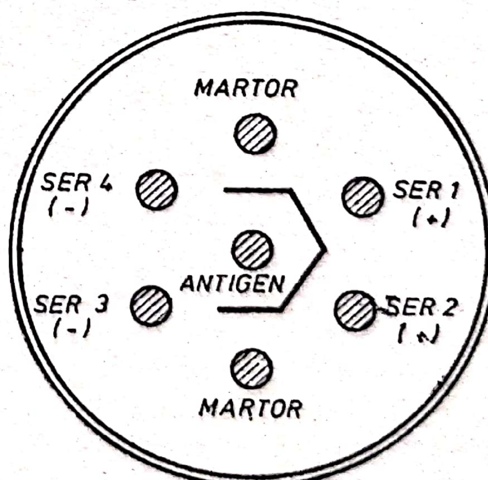


Fig. 60 — Schemă de amplasare a ingredientelor în reacţia de imunodifuziune în gel de agar şi liniile de precipitare care se formează

Pentru reacţie se folosesc următoarele elemente:

1 — un antigen AIE (anemie infecţioasă ecvină) preparat din splină de ponei sau cai, inoculaţi experimental cu tulpina de virus Wyoming (foarte patogenă) şi sacrificaţi la 11 zile de la inoculare. Antigenul trebuie să fie verificat sub raportul specificităţii sale. El se livrează în stare liofilizată, dizolvîndu-se în apă distilată, în proporţia indicată pe fiolă;

2 — ser pozitiv, verificat și care servește ca martor în interpretarea reacției;

3 — serurile suspecte provenind de la caii de examinat.

Pentru repartizarea acestora se folosesc micropipete Eppendorf sau, în lipsă, pipete Pasteur foarte fin efilate. Cantitatea este de 70 microlitri, sau mai simplu, pînă ce godeurile se umplu pînă la nivelul suprafeței agarului.

Amplasarea ingredientelor în godeurile agarului se face, în mod obișnuit, astfel: în godeul central se pune antigenul, în pozițiile 1 și 4 se pune ser pozitiv martor iar în pozițiile 2, 3, 5, 6 serurile suspecte. Deci în fiecare placă se pot testa 4 seruri suspecte. Se preferă cîte 2 godeuri cu ser martor pentru fiecare placă pentru a putea decela eventualele probe cu exces de anticorpi care nu oferă linii de precipitare, dar inhibă mai mult sau mai puțin apariția acestora în spațiul dintre antigen și martorul cel mai apropiat, astfel încît se pot face retestări cu serul respectiv diluat.

După repartizarea elementelor reacției, plăcile se acoperă și se țin la temperatura camerei. După 48 de ore, în cazul unei reacții pozitive vor apărea linii de precipitare, sub forma unor dungi albe-cenușii foarte fine, situate în spațiul dintre godeul cu antigen și serul respectiv. Ele pot fi observate numai cu ajutorul unei lămpi cu care se iluminează partea inferioară a plăcii. Între godeurile cu ser pozitiv și godeul central trebuie să existe întotdeauna linii distincte, ele servind ca element de comparație. Reacțiile pozitive nete sînt de obicei vizibile chiar după 24 de ore.

Izolarea şi identificarea virusurilor în diagnosticul infecţiilor virale la animale

În ultimele decenii, s-a impus cu stringenţă punerea la punct a unor metode de diagnostic, precise şi expeditive, pentru izolarea şi identificarea virusurilor. După descoperirea primului virus — cel al mozaicului tutunului, de către IVANOVSKI în 1892 — istoria ştiinţei medicale şi veterinare este plină de încercări menite să găsească mijloace noi de diagnostic virusologic.

Primele metode s-au bazat pe posibilităţile oferite de microscopia optică şi de mijloacele bacteriologiei clasice, între care, pe prim plan, s-au situat desigur inoculările experimentale.

Microscopia optică, cu toate limitele ei, a furnizat date preţioase prin punerea în evidenţă a consecinţelor acţiunii virusurilor în ţesuturi (apariţia incluziilor celulare, a alteraţiilor celulare şi tisulare cauzate de virusuri, a reacţiilor locale provocate de prezenţa virusurilor). Astfel, poate fi citată importanţa pe care o are la ora actuală punerea în evidenţă a corpusculilor Babeş—Negri în neuronii sistemului nervos central al animalelor afectate, evidenţierea incluziilor de natură virală din difterovariola păsărilor, din variola mamiferelor, din jigodia canină, din laringotraheita infecţioasă a păsărilor etc.

Punerea în evidenţă a corpusculilor elementari în frotiuri

Corpusculii elementari, reprezentînd, după cele mai multe aserţiuni conglomerate virale, deşi cu dimensiuni reduse (0,01—0,2 microni) pot fi puşi în evidenţă la microscopul optic, dacă se folosesc metode de colorare adecvate. Trebuie precizat însă că acest examen are o importanţă limitată în diagnosticul infecţiilor virale, deoarece numai o parte din agenţii inframicrobieni pot fi făcuţi vizibili în acest mod, iar pe de altă parte, pentru că aspectul morfologic fiind foarte asemănător la diferite specii, nu se poate face nici o diferenţiere. Mai frecvent, se practică asemenea metode în cazul infecţiilor rickettsiene şi pararickettsiene.

Pentru realizarea unor frotiuri bune, este important să se folosească lame subţiri, perfect degresate şi nezgîriate. Ele se pregătesc în prealabil astfel:

— se menţin timp de 24 de ore în amestec sulfocromic;

— spălare, de aceeaşi durată, în apă curgătoare;

— păstrare în alcool 50% pînă în momentul întrebuinţării, cînd se şterg cu tifon curat.

Frotiurile se realizează diferit, după materialul cercetat:

— prin impresiuni din organe ca creier, pulmon, ficat, splină, membrana vitelină (simpla atingere a suprafeţei de secţiune a acestora cu una din feţele lamei);

— prin întinderea cu ansă bacteriologică a unei picături în cazul lichidelor patologice: pleural (ornitoză, febra Q), peritoneal (limfogranulomatoza şoarecelui), testicular (infecţii rickettsiene experimentale), vezicular, lichide embrionare recoltate din ouăle embrionate inoculate cu asemenea agenţi, secreţii conjunctivale etc.

Frotiurile trebuie să fie cît mai subţiri şi uniforme.

Colorarea lor se face direct sau după o prealabilă fixare. Aceasta se poate face la flacără sau recurgîndu-se la anumiţi fixatori folosiţi în histologie, cum ar fi de exemplu fixatorul Dubosq—Brasil (timpul de fixare este de cca 2 ore, după care lamele se spală bine cu apă distilată).

Dintre metodele de colorare, cele mai frecvent folosite sînt descrise mai departe.

Coloraţia Machiavello — fixarea frotiurilor la flacără

— colorarea timp de 4 minute cu soluţie de fucsină diluată (0,25% fucsină bazică în soluţie tampon la pH 7,2—7,4 sau în apă distilată, adusă la acelaşi pH)

— diferenţierea timp de cîteva minute cu o soluţie de acid citric 0,5%

— spălare imediată cu apă de robinet

— colorare de contrast timp de 10 secunde cu o soluţie apoasă 1% de albastru de metilen.

Corpusculii elementari se colorează în roşu-intens-rubiniu, pe fondul albastru al elementelor celulare.

Coloraţia Stamp serveşte, ca şi precedenta, cu rezultate chiar mai bune, pentru colorarea corpusculilor elementari în infecţiile rickettsiene şi pararickettsiene. Constă în următoarele:

— fixarea frotiurilor la flacără

— lama răcită se acoperă cu fucsină fenicată diluată ex tempore 1/5 (1 parte fucsină concentrată Ziehl şi 4 părţi apă distilată) şi se ţine timp de 8—10 minute

— spălare cu apă de robinet

— colorare de contrast timp de 20—40 secunde, cu o soluţie de verde de malahit 2%

— spălare cu apă de robinet

— uscare, examinare.

Un frotiu bine colorat are culoarea verzuie sau uşor albăstruie. Corpusculii elementari se colorează în roşu-intens-rubiniu. Bacteriile se colorează în verde, albastru sau violet, după afinitate. Citoplasma celulelor se colorează în verde-pal sau în albastru-deschis.

Colorața Rommanowsky—Giemsa se foloseşte pentru colorarea frotiurilor în vederea punerii în evidenţă a corpusculilor elementari. Ames-

tecul colorant se folosește într-o concentrație dublă față de a celei utilizate în mod obișnuit pentru examenele hematologice. *Tehnica* constă în următoarele:

— colorare cu soluție Giemsa (diluată ex tempore în proporție de 30 picături la 15 ml apă distilată neutră), de preferință în băi Laveran, la 45°C timp de 12 ore, perioadă în care se recomandă împrospătarea soluției colorante de 3—4 ori
— spălare cu apă distilată
— diferențiere cu alcool 95° prin trecere alternativă în alcool apoi apă distilată, pînă cînd fondul preparatului examinat la microscop este debarasat de precipitate
— uscare
— examinare la imersie.

Corpusculii elementari apar colorați în roșu-purpuriu, pe un fond roz-pal.

Colorația Morozov se bazează pe impregnarea argentică. Ea folosește 3 soluții:

— Soluția A:

— acid acetic glacial	1,0 ml
— formol comercial 40%	2,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

— Soluția B:

— tanin	5,0 g
— fenol	1,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

— Soluția C:

— se dizolvă 5 g $AgNO_3$ în 100 ml apă bidistilată; 20 ml din soluție se pun de o parte, în timp ce la restul de 80 ml se adaugă, picătură cu picătură, o soluție de amoniac concentrat pînă cînd precipitatul brun, format, nu se mai dizolvă; în acest moment se iau cei 20 ml soluție lăsată de o parte și se toarnă picătură cu picătură în soluția de argint amoniacal, pînă cînd apare o ușoară opalescență. Soluțiile se păstrează în flacoane brune, bine închise.

Tehnica de colorare constă în următoarele:

— frotiul nefixat se ține 15 minute în apă distilată
— uscare
— se acoperă cu soluția A — timp de 1 minut
— spălare cu apă distilată
— se acoperă lama cu soluția B și se încălzește pînă la emisiunea de vapori
— spălare rapidă timp de 30 secunde în apă distilată
— se acoperă lama cu soluția C, diluată ex tempore în proporție de 1/10
— se încălzește pînă ce preparatul devine brun închis, avîndu-se grija ca soluția să nu fiarbă
— spălare cu apă distilată
— uscare
— examinare la imersie.

Corpusculii inframicrobieni apar colorați în brun-închis-negru, substanțele albuminoide în castaniu sau galben-deschis, iar fondul în nuanțe variabile de la galben pînă la brun.

Coloraţia Nicolau este o metodă simplă care foloseşte un singur colorant, constituit din:

— albastru de isamină (purissim)	1,0 g
— acid fenic	3,0 g
— alcool etilic	10,0 ml
— apă distilată	20,0 ml

Tehnica de colorare:

— frotiul nefixat sau fixat cu alcool metilic, se ţine 15 minute în apă distilată pentru dezalbuminare

— uscare

— se acoperă lama cu colorant

— se încălzeşte la flacără pînă la emisia de vapori, de 3—4 ori, timp de 5—10 minute, avîndu-se grijă ca soluţia colorantă să nu fiarbă

— spălare rapidă cu apă de robinet.

Corpusculii elementari apar coloraţi în albastru-deschis. Metoda are avantajul faţă de celelalte că, deşi colorează mai slab corpusculii elementari, nu produce niciodată precipitate care să se preteze la confuzii.

Coloraţia Zdrodovski se foloseşte mai ales pentru punerea în evidenţă a rickettsiilor în preparatele mai vechi. Colorantul este tiamina fenicată, preparată astfel:

— tiamină	1,0 g
— fenol	5,0 g
— alcool etilic	10,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

Din această soluţie se prepară soluţia de lucru adăugînd la 10 ml apă distilată, 10—15 picături din amestecul de bază.

Tehnica de colorare:

— frotiurile subţiri se fixează la flacără şi se acoperă timp de 5 minute cu soluţia colorantă

— spălarea prelungită cu apă de robinet

— uscare, examinare la imersie.

Rickettsiile apar colorate în albastru-închis, pe un fond albastru-deschis.

Punerea în evidenţă a incluziilor în frotiuri

Incluziile sînt consecinţa interacţiunii dintre virus şi celula gazdă şi apar ca nişte formaţiuni de 1—30 microni, situate în citoplasmă, în nucleu sau în ambele, de forme variabile (sferoide, ovalare sau neregulate). Prin distrugerea celulelor în care au luat naştere, pot fi puse în evidenţă şi în stare liberă.

Ele au o afinitate cromatică oxifilă şi apar de obicei înconjurate de un spaţiu clar, de aspectul unui halou caracteristic ceea ce facilitează identificarea lor.

Metoda Sellers este una din metodele cele mai importante de punere în evidenţă a incluziilor, folosită în special pentru diagnosticul rapid al turbării.

Pentru colorare se folosește un amestec dintr-o soluție de albastru de metilen și o soluție de fucsină.

Prepararea soluțiilor:

Soluția A:

— albastru de metilen	2,0 g
— alcool metilic absolut	100,0 ml

Soluția B:

— fucsină bazică	4,0 g
— alcool metilic absolut	100,0 ml

Soluțiile se păstrează la frigider. Din acestea, în momentul folosirii se prepară soluția colorantă de lucru:

— soluție A	15,0 ml
— soluție B	2—4 ml
— alcool metilic absolut	25,0 ml.

Tehnica de colorare. Frotiul făcut din sistemul nervos central, prin amprentă, se acoperă cu soluția colorantă și se lasă astfel 4—5 secunde. Se spală, se usucă la aer (în nici un caz cu hîrtie de filtru) și se examinează la imersie. Celulele nervoase se colorează în albastru-deschis, țesutul interstițial în roz, hematiile în roșu-portocaliu, iar incluziile în roșu-rubiniu strălucitor.

În același scop se mai pot folosi și alte metode.

Colorația Mann — frotiurile snît fixate în alcool metilic timp de 5 minute, după care se usucă

— se acoperă lama cu amestecul colorant Mann (se preferă o soluție veche de cel puțin 2—3 zile)

— se încălzește la flacără pînă la emisia de vapori de 3—4 ori timp de 10 minute, avînd grijă ca amestecul colorant să nu fiarbă

— spălare rapidă cu alcool absolut

— diferențiere foarte rapidă cu alcool alcalin

— spălare cu alcool absolut

— trecere pentru cîteva secunde în alcool acid (alcool absolut cu acid acetic)

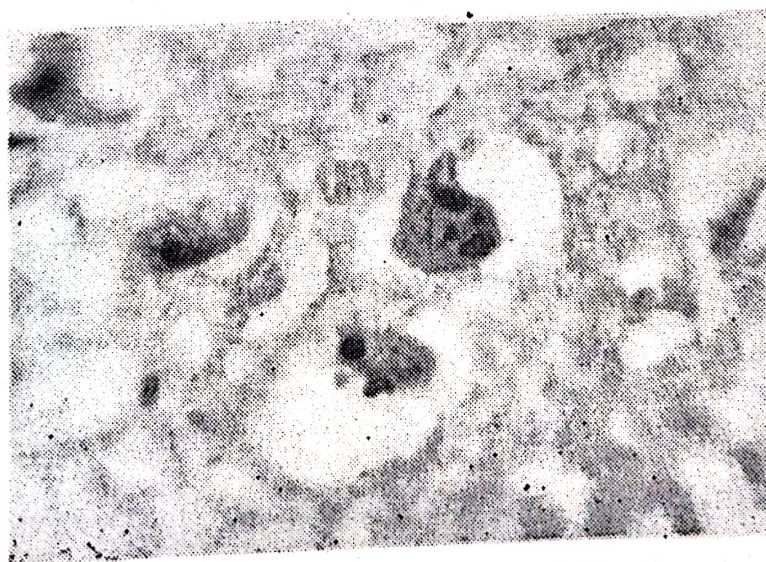


Fig. 61 — Corpusculi Babeș-Negri

— spălare cu alcool absolut

— clarificarea cu xilol şi montarea în balsam de Canada.

Incluziile apar colorate în nuanţe variind de la roşu la roşu-violaceu, pe un fond albastru-deschis sau albastru-violaceu. Hematiile sînt colorate în roşu-murdar.

Metoda Muromţev — frotiurile proaspete, chiar umede, se fixează în alcool metilic sau acetonă, timp de 1—2 ore, la temperatura camerei sau timp de 20 minute la 45°C

— spălare cu apă distilată

— se acoperă frotiurile timp de 5—10 minute cu soluţie de albastru de metilen 2% preparată după formula Manson (albastru de metilen 2,0 g şi borax 5,0 g la 100 ml apă distilată fierbinte)

— fără a fi spălate, frotiurile se trec într-o soluţie apoasă de tanin 10%, pînă la apariţia unei coloraţii albastră-deschisă a întregului frotiu (cca 10 minute)

— spălare cu apă distilată

— uscare

— trecere rapidă în amestecul alcool absolut-acetonă, în părţi egale şi apoi, tot rapid, în alcool absolut.

Incluziile apar colorate în violet, pe un fond albastru-palid, cu nuclei albaştri.

*
* *

Dintre metodele folosite de bacteriologie care au fost foarte utile diagnosticului virusologic, filtrarea a fost cea care a furnizat primele relaţii cu privire la însăşi existenţa virusurilor. Trecerea virusurilor prin filtrele care opresc bacteriile şi reproducerea cu ajutorul filtratelor a unor stări de boală asemănătoare cu a animalelor de la care provine materialul respectiv, este indiciul existenţei unui agent care a traversat aceste filtre şi este responsabil de tulburările respective. Reproducerea pe animale de experienţă (cobai, şoareci, hamsteri, şobolani etc.) a unor stări de boală în serie, a constituit metoda prin care s-a demonstrat multă vreme un diagnostic virusologic. Au fost folosite cele mai variate specii de animale de laborator şi din natură, însă, cu toate succesele remarcabile obţinute în experimentul pe animale, adulte sau extrem de tinere, aflate în stare fiziologică normală sau cu un metabolism modificat prin metode chimice sau fizice, acestea nu au dat rezultate pe deplin satisfăcătoare pentru toate virusurile.

Introducerea organismelor embrionare, care sînt mai puţin diferenţiate din punct de vedere morfologic şi funcţional şi deci mai susceptibile la multiplicarea virusurilor, a determinat un salt calitativ substanţial în evoluţia inframicrobiologiei. Folosirea embrionilor, şi în special a celor de găină, a permis cultivarea de virusuri noi, şi în acelaşi timp, cercetarea relaţiilor calitative şi cantitative ale virusurilor cu organismul-gazdă. Ea a stat şi la baza preparării unor noi tipuri de vaccinuri antivirale.

La ora actuală izolarea, întreţinerea şi cercetarea virusurilor se bazează pe folosirea următoarelor procedee principale: culturi celulare; ouă embrionate; animale de experienţă.

Recoltarea şi prepararea materialului patologic

Materialele patologice care se recoltează în vederea izolării unui agent viral pot proveni de la animale în viaţă sau de la cadavre. După natura lor pot fi:

— fragmente de ţesut (sistem nervos central, ganglioni, organe interne etc.);

— secreţii şi excreţii (fecale, urină, lichide de spălături nasofaringiene, conjunctivale etc.);

— diferite lichide organice (lichid cefalorahidian, sînge, conţinutul erupţiilor veziculare, lichide embrionare etc.).

Pot servi pentru izolarea unor virusuri şi alte elemente ale mediului extern care se presupune că au fost contaminate (apele potabile, reziduale etc.).

Dacă unele materiale patologice pot fi inoculate ca atare (în cazul în care ele sînt recoltate în condiţii de asepsie şi nu conţin germeni bacterieni ab initio), altele necesită o prelucrare, atît pentru sterilizarea lor sub raport bacteriologic, cît şi pentru aducerea lor într-o formă adecvată inoculării.

a) *Fragmentele de ţesut* se recoltează în condiţii cît mai severe de asepsie (prin biopsie sau necropsie), se spală de eventuale cheaguri de sînge, după care se mojarează în mojare sterile sau se omogenizează în omogenizatoare (mixere) special destinate acestui scop. Omogenizarea se va face adăugînd soluţie fiziologică sterilă sau soluţie Hanks în proporţia necesară pentru a realiza o suspensie de 1/10—1/20. Suspensia obţinută va fi congelată la —20°C, —60°C şi decongelată de cîteva ori (cu scopul de a obţine distrugerea celulelor şi punerea în libertate a materialului viral). După ultima dezgheţare, suspensia se centrifughează 45 minute la 4000—6000 turaţii/minut, obţinîndu-se un supernatant limpede, care se foloseşte pentru inoculare.

b) *Fecalele* servesc ca material patologic pentru izolarea enterovirusurilor la bovine şi porcine, adenovirusurilor etc. Ele se recoltează în recipiente sterile (eventual cu dop de sticlă şi cu o linguriţă specială), sau în eprubete cu soluţie Hanks şi anse cu tampoane de vată sterile. Prin adăugarea unei soluţii fiziologice obişnuite, a unei soluţii saline tamponate sau a soluţiei Hanks, se va realiza o suspensie 1/10 care, după omogenizarea temeinică, va fi centrifugată 20 de minute la 3000 turaţii/minut pentru debarasarea de particule mari. Supernatantul se va împărţi în două probe separate, uneia adăogîndu-i-se 500 UI penicilină/ml şi 5 gamma streptomicină/ml, iar cealaltă fiind inclusă într-o fiolă care se păstrează ca rezervă. Ambele probe se depozitează la —20°C. După 24 de ore proba conţinînd antibiotice se decongelează, se centrifughează 45 minute la 5000—6000 turaţii/minut. Supernatantul se decantează, el urmînd a fi inoculat.

c) *Secreţii nasofaringiene* se recoltează cu ajutorul unor tampoane de vată fixate pe baghete metalice, introduse în eprubete şi sterilizate odată cu acestea prin autoclavare. După recoltare se procedează la suspendarea materialului recoltat în soluţie salină tamponată (SST) sau soluţie salină Hanks cu antibiotice, se congelează 24 de ore la —20°C, după care se decongelează şi se centrifughează 45 minute la 4000—6000 turaţii/minut.

d) *Urina* se centrifughează, se aduce la un pH de 7,2—7,4 cu o soluţie tampon, se adaugă antibiotice, se ţine la 37°C 30 minute după care se inoculează.

e) *Sîngele şi lichidul cefalorahidian* nu necesită nici un fel de prelucrare prealabilă, dacă sînt recoltate în condiţii de asepsie. Sîngele se poate folosi ca sînge total, heparinizat, sînge coagulat sau numai serul sanguin.

f) *Lichidele veziculare,* obţinute prin puncţia veziculelor din bolile eruptive, cum ar fi febra aftoasă şi exantemul vezicular al porcului, se vor folosi ca atare sau se vor dilua eventual în SST sau soluţie Hanks sterilă. Se va avea grijă ca recoltarea să se facă aseptic, suprafaţa tegumentului dezinfectîndu-se, în prealabil, cu alcool sau cu alt antiseptic, însă de aşa manieră încît acesta să nu vină în contact cu lichidul vezicular, deoarece ar putea avea efecte nocive pentru virusurile respective. Seringa şi acele cu care se face puncţia trebuie să fie şi ele sterilizate în prealabil, dar numai prin fierbere.

În cazul unor boli eruptive (febra aftoasă şi exantemul vezicular al porcului) este bine să se recolteze lichide veziculare (din vezicule nesparte) însoţite de epitelii din afte proaspăt sparte (1—2 g). Ele se spală în ser fiziologic steril tamponat (pH 4—7,6) în eprubete sterile.

g) *Probele de ape reziduale* se recoltează steril, se adaugă antibiotice şi fungostatice, se congelează la —20°C, se decongelează, se centrifughează şi din supernatant se fac inoculări.

Baza materială necesară pentru lucrările de virusologie

Un laborator de virusologie corespunzător trebuie să fie dotat cu diferite încăperi care să permită desfăşurarea lucrărilor de prelucrare a materialelor patologice, de izolare şi identificare a virusurilor, fără pericolul de a disemina materii virulente şi fără riscul de a contamina personalul.

O primă parte este reprezentată de filtrul cu dezinfector pentru încălţăminte şi mîini, vestiar şi duşuri.

Laboratoarele sînt, în funcţie de volumul de lucrări, diversitatea acestora şi personalul de care se dispune, mai numeroase sau mai restrînse numeric. În orice caz este total contraindicat ca în laboratoarele destinate virusologiei să se desfăşoare şi lucrări de bacteriologie sau micologie. Ele trebuie să dispună de termostate sau cameră termostat precum şi de frigidere, congelatoare sau camere frigorifice proprii. Acelaşi lucru este valabil pentru celelalte anexe: camera de sterilizare, „bucătăria“ şi încăperile destinate animalelor de experienţă. Toate încăperile secţiei de virusologie trebuie să aibă canalizare proprie cu posibilităţi de sterilizare termică sau chimică. Pardoseala şi pereţii pînă la o înălţime de 1,80—2 m, în toate încăperile trebuie să fie uşor de spălat şi dezinfectat (de preferinţă material plastic respectiv faianţă sau în ulei). Pentru asigurarea condiţiilor de sterilitate, mai des în cazul inoculărilor, este absolut necesar să existe boxe sterile, bine etanşeizate, cu posibilităţi de sterilizare prin raze ultraviolete, cu sursă de gaze, vacuum şi eventual evacuare prin filtru.



Fig. 62 — Sticlărie folosită în lucrările de virusologie

Mobilierul este bine să fie ușor de curățat și dezinfectat (de preferință acoperit cu un strat de materiale sintetice, cel puțin pe suprafețele unde se lucrează direct).

Ustensilele și instrumentarul trebuie să fie de bună calitate (din materiale inoxidabile) și în număr suficient pentru a permite o continuitate a fluxului de lucrări chiar în condițiile unui volum sporit.

În vederea spălării corespunzătoare a sticlăriei, trebuie să se prevadă vase mari de 10—30 l, din material plastic, rezistent față de acizi pu-

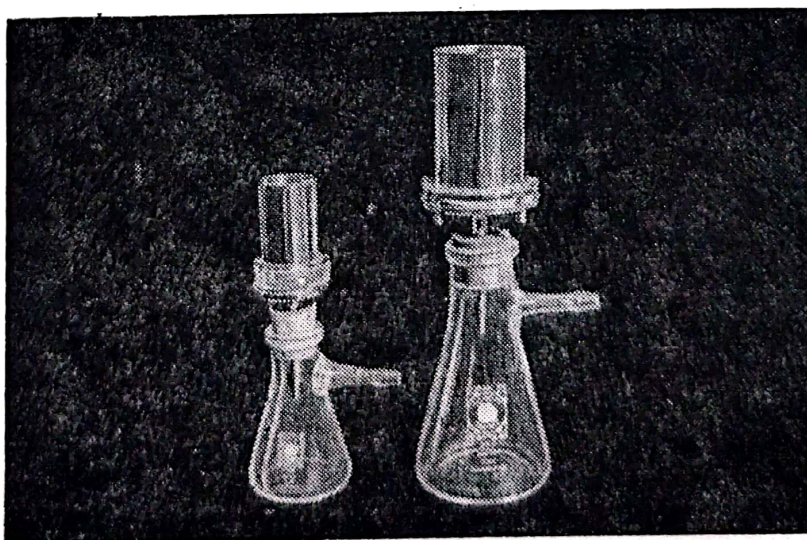


Fig. 63 — Filtre Seitz

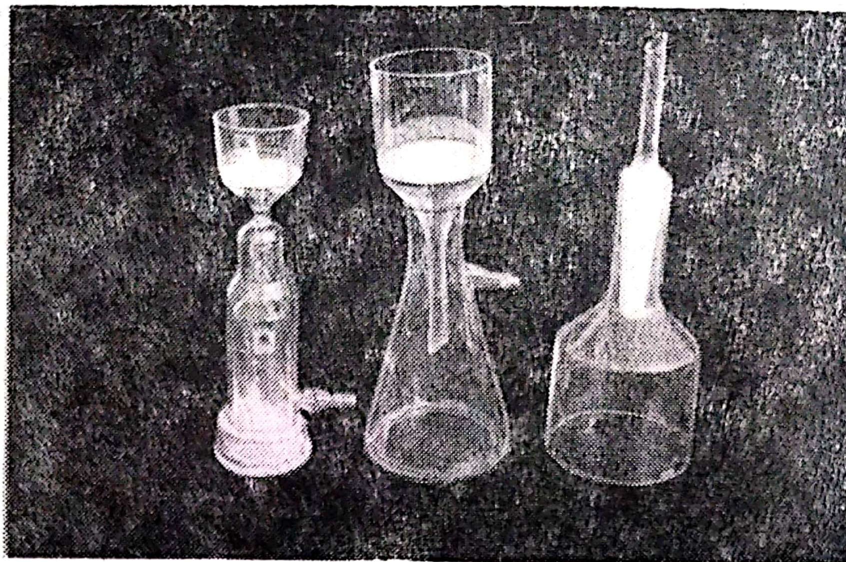


Fig. 64 — Filtre de sticlă

ternici, iar pentru uscare suporturi speciale sau dulapuri termice (100°C). Pentru sterilizare trebuie să existe atît autoclave cît și etuve. În general, este bine ca sectorul de sterilizare să fie împărțit în două: o parte pentru materiale contaminate și alta pentru materiale sterilizate. Unde condițiile o permit, despărțirea se poate face prin amplasarea unor mijloace de sterilizare cu dublu acces: unul prin care se introduc pentru sterilizare (din camera cu materiale contaminate) și altul prin care se scot sterilizate.

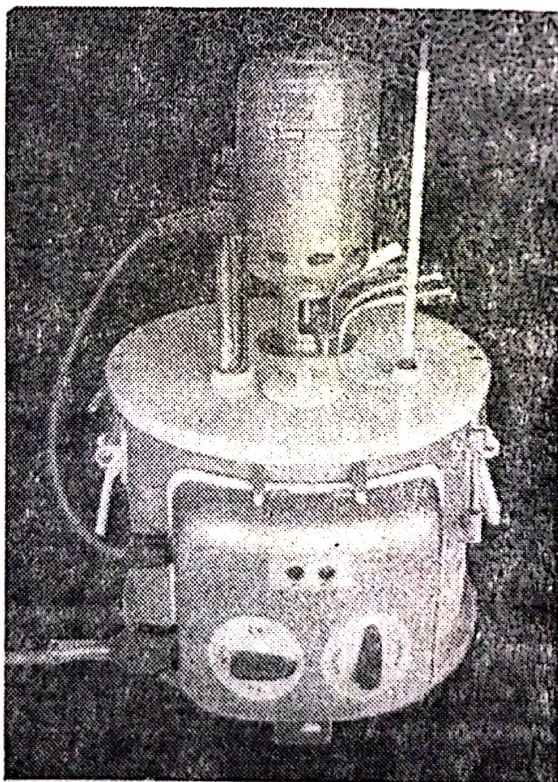


Fig. 65 — Ultratermostat Hoepler

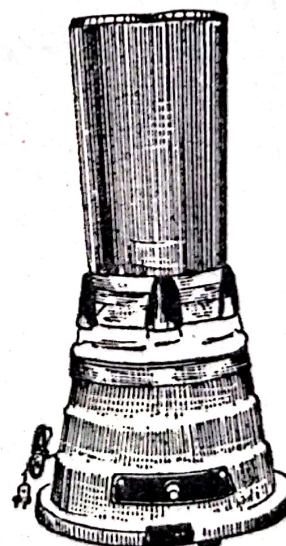


Fig. 66 — Triturator electric pentru organe

Dintre aparatele absolut necesare nu trebuie omise centrifugele de diferite capacități (eventual cu refrigerare), dar neapărat cu cupe de mare capacitate, omogenizatoare electrice, dispozitive de filtrare, termocupluri reglabile pentru lichide, pH-metre, balanțe analitice (de preferință automate), aparat de bidistilat apa, din sticlă și cu posibilități de deionizare, seringă automată de tip Cornwal, eventual aparat de liofilizare.

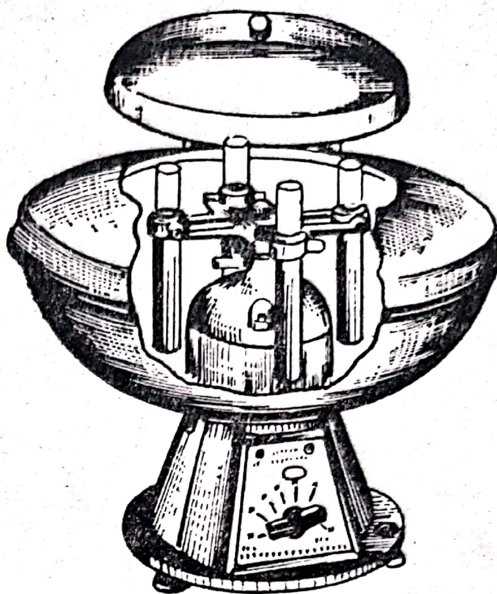


Fig. 67 — **Centrifugă unghiulară**

O importanță deosebită o are sticlăria ce se folosește în virusologie. Aceasta trebuie să fie de cea mai bună calitate (Jena, Pyrex sau în orice caz neutră; în țara noastră sticla neutră de Turda s-a dovedit de bună calitate). Ea trebuie prelucrată deosebit de atent, atît la prima folosire cît și pe parcurs.

Sticlăria nouă, după unele recomandări, se tratează astfel:

— se fierbe timp de 20 minute într-o soluție slabă de acid (0,2—0,3‰ acid sulfuric, clorhidric sau acetic);

— neutralizare cu o soluție slabă de sodă caustică (0,2‰);

— spălare temeinică cu apă de robinet și clătire de cca 6—8 ori;

— clătire cu apă distilată de 3—4 ori;

— clătire cu apă bidistilată;

— tratare cu soluție 0,05—0,1‰ carbonat de sodiu în apă bidistilată, în vase mari smălțuite sau din aluminiu; se încălzește o oră la 60°C; se lasă să se răcească;

— clătire cu apă bidistilată, deionizată, în 2—3 băi, după care se pun cu gura în jos într-un coș sau pe un prosop curat;

— se pun la uscare în dulapuri termice;

— se sterilizează la pupinel (180—200°C) după ce, după caz, au fost astupate și învelite în hîrtie sau folie de aluminiu.

Sticlăria folosită se tratează doar cu soluție de carbonat și apoi întocmai ca cea nouă.

În unele laboratoare se folosesc numai detergenți, tratamentul fiind variabil cu tipul folosit, dar în principiu după o fierbere cu detergent se procedează la spălarea individuală în apa respectivă, cu peria și clătirea abundentă cu apă de robinet (de cel puțin 6 ori), după care se face clătirea cu apă distilată, bidistilată și apoi deionizată și se sterilizează. Ca principiu general, trebuie subliniată indicația de a nu se lăsa niciodată sticlăria să se usuce înainte de spălare. Imediat după folosire se scufundă într-un dezinfectant sau se autoclavează și apoi se pune în apă distilată.

Dacă sticlăria este foarte murdară este indicat să se scufunde timp de cîteva zile într-o soluție de bicromat.

Problema spălării sticlăriei poate fi însă complet rezolvată prin folosirea materialului plastic ce se aruncă după întrebuințare. Trebuie specificat însă că nu toate tipurile se pretează pentru culturi celulare.

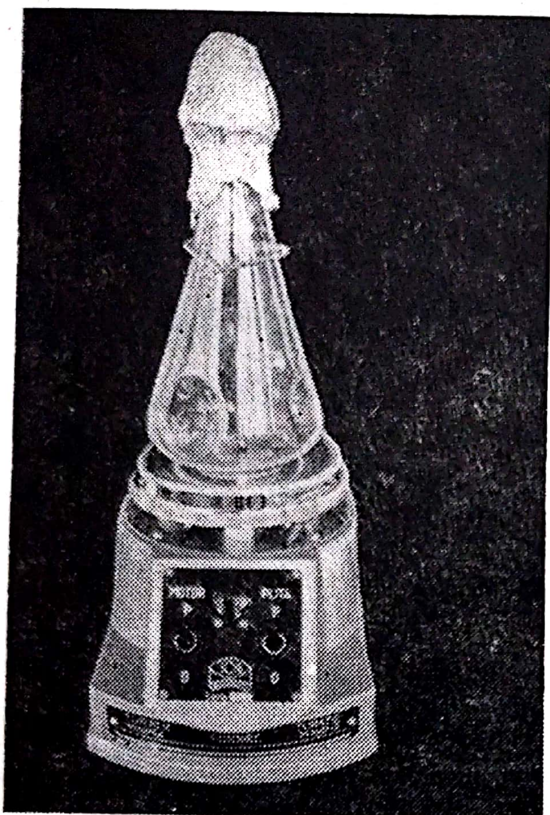


Fig. 68 — Agitator magnetic tip IOR

Dopurile de cauciuc, trebuie și ele tratate cît se poate de atent, deoarece pot să conțină substanțe sau reziduuri care îngreunează sau compromit chiar unele lucrări:

— tratare cu acid slab;
— neutralizare alcalină;
— fierbere în soluție de carbonat de sodiu 0,05—0,1%;
— spălare abundentă în apă de robinet;
— spălare în apă distilată, bidistilată și deionizată;
— se pun apoi pe hîrtie de filtru sau tifon curat pentru uscare;
— se pun în plăci Petri mari, pe fund avînd hîrtie de filtru, se acoperă cu o altă hîrtie de filtru, se pune capacul plăcii, se împachetează în hîrtie obișnuită și se sterilizează la autoclav.

Cît privește chimicalele, ele trebuie să fie de mare puritate (p.a.), deoarece orice urme ale unor ioni (Cupru, Arseniu, Zinc etc.) sînt foarte toxice pentru culturile celulare și pot compromite total lucrările de virusologie. Cînd este vorba de anumiți aminoacizi este bine să se prefere acele produse care poartă specificarea „pentru culturi celulare".

Culturile celulare în diagnosticul virusologic

Găsirea unei modalități propice pentru cultivarea virusurilor a fost o necesitate obiectivă, dat fiind faptul că virusurile, după cum se știe, sînt cultivabile numai pe celula vie. Ele nu sînt capabile să se multiplice în medii inerte, în afara celulei vii și nici să desfășoare procese metabolice independente. Replicarea lor este asigurată de către celula-gazdă care, pe baza informației genetice imprimată de virus, își modifică întregul cod al sintezelor celulare.

Introducerea culturilor celulare în virusologie a reprezentat unul din cei mai importanți pași în cunoașterea virusurilor. Posibilitatea de a întreține în condiții artificiale, de laborator, grupuri de celule vii, cu capacitatea de a desfășura un metabolism propriu activ (realizată pentru prima dată de HARRISSON în 1907), a creat premizele cultivării virusurilor și implicit ale studierii relațiilor intime care se stabilesc între acestea și celulele gazdă.

În principiu, culturile celulare sînt celule vii, aparținînd diferitelor tipuri de țesuturi, normale sau patogene, adulte sau embrionare, mai mult sau mai puțin diferențiate. Dacă țesuturile adulte se cultivă mai greu, au o dezvoltare mai lentă și o viabilitate mai scurtă, țesuturile em-

brionare se cultivă mai ușor, au o creștere rapidă și o viabilitate mai mare. Ele sînt, de fapt, preferate atît în procesele de izolare, cît și în cele de întreținere a virusurilor.

Pentru cultivarea celulelor într-un mediu artificial se pot folosi metode diferite. Cele mai importante sînt următoarele:

— cultura pe lamă (fragmente de țesuturi sînt incluse în coaguli de plasmă pe suprafețe de sticle);

— cultura în suspensie, în care celulele plutesc în lichide nutritive;

— cultura în monostrat, în care celulele, prin diviziune, constituie un strat uniform pe suprafața inferioară a recipientului cu mediu nutritiv. Aceasta din urmă este cea mai larg folosită în practică.

Din alte puncte de vedere culturile celulare pot fi:

— *culturi celulare primare,* sau culturi de celule proaspete, se prepară din diferite țesuturi normale prelevate direct din organism, de preferință embrionare. Spectrul virusurilor ce se cultivă pe ele este de cele mai multe ori relativ larg. Astfel, sînt culturile de fibroblaști de pui, culturile epiteliale embrionare de la păsări și mamifere, celulele renale și testiculare de la embrioni sau animale foarte tinere;

— *culturi de linii celulare diploide* sînt culturi de celule primare propagate în serie, constituite din cel puțin 80% celule cu același număr de cromozomi și aceeași morfologie cromozomică (cariotip) ca și celulele din țesutul de origine. Numărul de pasaje ce poate fi efectuat depinde într-o măsură considerabilă de țesutul și specia de animal din care provin. Unele țesuturi bovine și porcine pot fi pasate de 30—60 de ori, în timp ce cele de la alte specii, de obicei, nu mai mult de 5—6 ori. Au o morfologie fibroblastică, chiar dacă provin din celule epiteliale, cam după al 5-lea pasaj. Nu se cultivă în submersie. Susceptibilitatea lor față de diferite virusuri este identică cu aceea a țesuturilor primare;

— *culturi celulare permanente, heteroploide sau seriale* sînt celule cu un număr anormal de cromozomi și morfologic capabile de a fi menținute indefinit *in vitro* prin pasaje în serie. Ele sînt denumite în general linii celulare permanente și se caracterizează prin număr cromozomial heteroploid, lipsa unei diferențieri histotipice, prin semnele morfologice ale unei degenerări maligne, prin creștere în submersie și un spectru viral mai restrîns decît precedentele. Provin din diferite țesuturi tumorale maligne (mai ales de tip epitelial, dar și conjunctive — sarcoame). Au o proliferare foarte activă și o rată de multiplicare mare. Se bucură de o largă răspîndire în laboratoarele de virusologie și genetică avînd o uniformitate morfologică celulară, sînt ușor de manipulat și pot fi folosite de laboratoare diferite (aceeași linie celulară permițînd desfășurarea investigațiilor între aceiași parametri) și, în fine, exclud posibilitatea precontaminării cu alte virusuri (cum se întîmplă uneori în cazul culturilor de celule primare). Astfel, pot fi amintite liniile celulare HeLa (din carcinom de col uterin uman), HEp2 (din carcinom laringian uman), Detroit 6 (din carcinom pulmonar uman), KB (din carcinom nasofaringian uman), BHK-21 (din rinichi de hamster), Vero (din rinichi de maimuță etc).

Recoltarea țesuturilor destinate culturilor celulare primare trebuie să respecte următoarele principii:

— animalul de la care provin trebuie să fie indemn de boli bacteriene și virale;

— să se asigure condiţii de asepsie cît mai riguroase (recoltarea să se facă în recipiente şi cu instrumente sterilizate) evitîndu-se folosirea de substanţe antiseptice;

— ţesutul recoltat să fie cît mai puţin traumatizat (strivit cu pensa, zdrobit etc.) pentru a nu se distruge o cantitate prea mare de celule;

— recoltarea să se facă cît mai curînd după sacrificare, pentru ca viabilitatea ţesuturilor recoltate să nu aibă de suferit;

— timpul scurs între recoltarea şi prelucrarea celulelor pe cît posibil nu trebuie să depăşească 3—4 ore, în acest interval asigurîndu-se o temperatură joasă (+4°C) şi un mediu salin cu antibiotice.

Dezavantajul culturilor primare constă în aceea că ele pot fi folosite, de cele mai multe ori, o singură dată, fără ca din ele să se mai poată face pasaje celulare ulterioare. Pentru unele celule sînt totuşi posibile 2—10 subpasaje. Din altele se pot obţine linii celulare continue (culturi permanente).

Modul de recoltare diferă în funcţie de natura ţesutului ce urmează a fi prelucrat. În cazul ţesuturilor embrionare animale (iepuri, şoareci, cobai, şobolani) se procedează la sacrificarea rapidă a femelei gestante şi la extirparea chirurgicală, în condiţii de asepsie cît mai severe, a uterului. Embrionii sînt apoi eliberaţi de învelişurile placentare şi trecuţi în recipiente sterile, după care se trece la recoltarea aseptică a organelor sau a porţiunilor de organe necesare preparării culturilor celulare (rinichi, testicul, pulmon, ficat, rar piele sau diferite alte epitelii). Vîrsta embrionilor variază cu scopul urmărit, în sensul că pentru cultivarea celulelor de embrion total se preferă embrionii tineri, din prima perioadă a gestaţiei, în timp ce pentru celule din anumite organe se vor prefera embrionii de la sfîrşitul gestaţiei, cînd aceştia sînt deja dezvoltaţi.

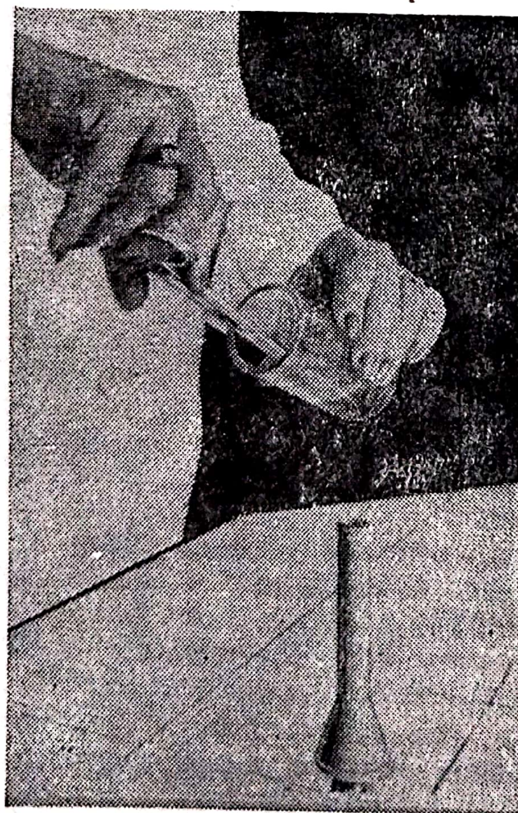


Fig. 69 — **Mărunţirea manuală a organelor în cupa de centrifugă**

Embrionii de pasăre se folosesc în general între a 9-a şi a 13-a zi de incubaţie.

Pentru recoltarea de ţesuturi de la tineret, vîrsta animalelor este variabilă cu specia (viţei 1—2 luni, purcei 1—2 luni, pui şi boboci 3—4 săptămîni, căţei 1—2 luni etc.). Sacrificarea prin sîngerare este urmată de prelevarea şi prelucrarea aseptică a organelor respective.

În cazul ţesuturilor, provenind de la animale în viaţă, acestea se recoltează prin intervenţie chirurgicală (biopsie: piele, mucoase, amgidale, ganglioni, muşchi, ficat, rinichi etc.). Ele se introduc imediat într-o soluţie salină cu un conţinut ridicat de antibiotice (600—1000 U.I. penicilină/ml şi 300—500 gamma streptomicină pe ml) în care vor fi lăsate 2—3 ore.

Recoltarea este urmată de o serie de operaţiuni menite să separe celulele una de alta, obţinîndu-se suspensii celulare uniforme. În acest scop, se procedează întîi la spălarea ţesuturilor de coagulii de sînge, şi de detritusurile tisulare, folosindu-se soluţii saline sterile (Hanks sau soluţii tampon), după care urmează fragmentarea cît mai fină cu ajutorul unor instrumente sterilizate prin fierbere (foarfeci, pense, bisturie). Separarea propriu-zisă a celulelor se realizează fie prin metode fizice (agitarea suspensiilor de fragmente tisulare embrionare şi decantarea), fie prin metode chimice, folosindu-se substanţe care dizolvă chitul intercelular. Dintre acestea, cele mai bune rezultate le oferă tripsina, pancreatina, papaina, colagenaza, elastaza. Prima este cel mai frecvent folosită, concentraţia optimă fiind de 0,25‰. De fapt în cazul metodelor chimice nu este vorba de o acţiune pur chimică, ci de asocierea unor factori chimici (enzime sau agenţi chelatori) cu factori mecanici (agitarea).

Contează foarte mult şi marca tripsinei, în sensul că, de exemplu, în timp ce tripsina Difco şi N.B.C. dau suspensii celulare omogene, tripsina Merck şi BDH, deşi dau iniţial suspensii de calitate, în timp ele tind să aglutineze în mase mucoide care nu permit o bună cultivare. Dizolvarea tripsinei se face în soluţii saline tamponate (SST) la un pH 7,4—7,6 sau în soluţie nutritivă Hanks.

Soluţia salină tamponată (SST sau PBS — Phosphat buffered solution) se prepară sub formă de două sau trei soluţii-stoc, concentrate de 10 ori.

Soluţia I:

— NaCl	80,0 g
— KCl	2,0 g
— Na_2HPO_4	11,5 g
— KH_2PO_4	2,0 g
— Apă bidistilată ad	1 000,0 ml

Soluţia II:

— $CaCl_2$ anhidru	1,0 g
— Apă bidistilată ad	500,0 ml

Soluţia III:

— $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,0 g
— Apă bidistilată ad	500,0 ml

Soluţiile se păstrează în sticle separate la +4°C. Înainte de folosire, ele se diluează astfel: 100 ml soluţie I + 700 ml apă şi separat 50 ml soluţie II + 50 ml apă, şi 50 ml soluţie III + 50 ml apă, care apoi se amestecă şi se sterilizează la autoclav (20 minute la 0,8 atmosfere). Soluţiile II şi III pot fi omise, în acest caz diluarea soluţiei I făcîndu-se în proporţie de 100 ml soluţie concentrată + 900 ml apă bidistilată.

Tripsinizarea

Tripsinizarea se realizează în flacoane asemănătoare cu baloanele Erlenmayer, doar că li s-au adus diferite modificări (renuri, tuburi de captare laterală etc.), cu scopul de a realiza o cît mai rapidă separare şi captare a celulelor. Contactul cît mai intim cu ţesutul şi continua agitare sînt realizate cu ajutorul unor agitatoare magnetice. Flacoanele

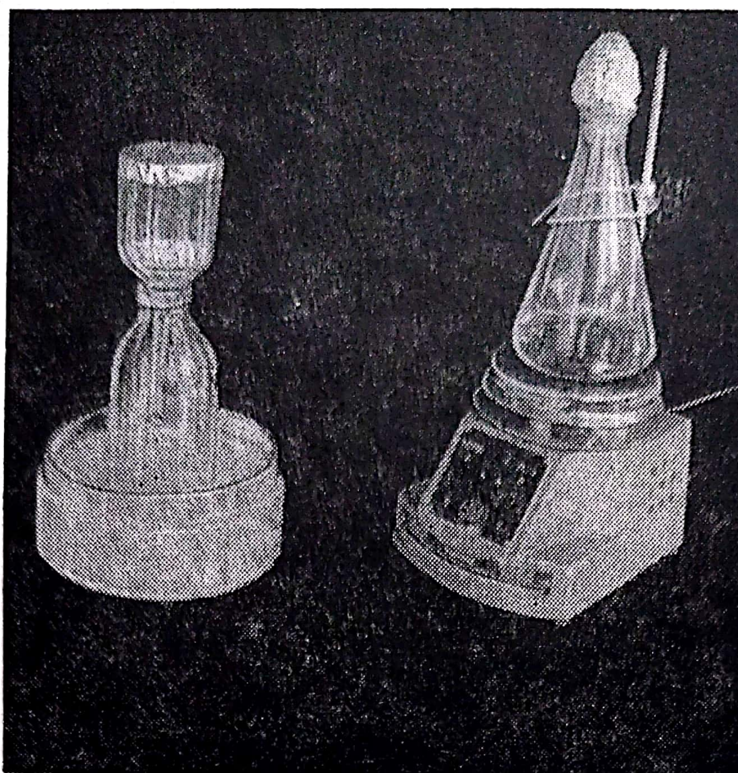


Fig. 70 — Tripsinizarea discontinuă deschisă

de tripsinizare sînt sterilizate în prealabil, avînd în interiorul lor o bară magnetică îmbrăcată în sticlă, material plastic sau silicon, care realizează omogenizarea permanentă a suspensiei. Reglarea turației agitatorului trebuie să fie astfel făcută încît să nu fie prea mare. Înaintea începerii tripsinizării propriu-zise, se recomandă o pretripsinizare de 30—45 minute la 34°C, sub agitație continuă la agitatorul magnetic, avîndu-se grijă ca peste fragmentele de țesut să se adauge o cantitate de 5—10 ori mai mare de tripsină.

Ea are loc la o temperatură optimă de 34—37°C (în nici un caz peste 40°C). După 5—10 minute de agitație, urmată de un repaus de cca 30 secunde, se colectează într-un vas separat suspensia de celule astfel obținută și se aruncă. Peste țesuturile din flaconul de tripsinizare se adaugă o nouă cantitate de soluție de tripsină, care se resupune aceluiași proces, obținîndu-se în acest fel o serie de șarje de suspensii celulare, pînă la epuizarea țesutului. Țesutul se consideră epuizat cînd majoritatea

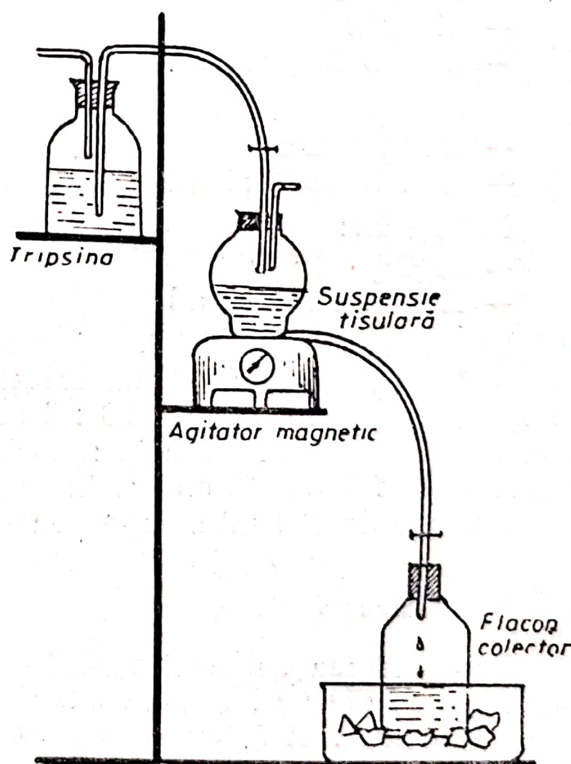


Fig. 71 — Tripsinizarea continuă închisă

fragmentelor au un aspect albicios, zdrențuit. Epuizarea are loc cu atît mai repede cu cît țesutul respectiv este mai tînăr (în general după 15—25 de șarje, durînd 60—90 minute). Făcînd abstracție de variantele metodelor de tripsinizare (tripsinizarea continuă, discontinuă închisă, discontinuă deschisă etc.) operațiunea propriu-zisă este urmată de captarea suspensiei celulare și de oprirea procesului de tripsinizare. Aceasta se realizează prin punerea vasului în care se captează șarjele succesive de suspensie celulară într-un alt vas cu cuburi de gheață. Aceasta oprește acțiunea enzimei, prevenind în acest fel liza celulelor, prin acțiunea prelungită asupra pereților celulari. După unii autori, se obține o tripsinizare bună, cînd se lucrează alternativ cu o soluție de tripsină și SST (P.B.S.), ceea ce realizează o bună menajare a celulelor.

Separarea celulelor de soluția de tripsină se face prin centrifugare în cupe de capacitate corespunzătoare, la turații reduse (800—1 000 turații/minut timp de 6—8 minute). Sedimentul va fi resuspendat într-o cantitate cunoscută de mediu nutritiv sau, în cazul că se preconizează o spălare suplimentară, aceasta se face cu SST. Este necesar să se asigure o concentrație optimă a celulelor în suspensia finală. Ea este în jur de 3—4×10^5 celule/ml mediu. Determinarea ei se face prin măsurători în camere obișnuite de numărat elemente figurate sau, după o oarecare experiență, prin aprecierea cu ochiul liber a gradului de turbiditate a suspensiei. Pentru numărătoare, se face o diluție de 1/10—1/1000 în mediul de creștere, se adaugă o picătură dintr-o soluție 1‰ de albastru de tripan, și după o agitare temeinică, se pune într-o cameră Fuchs—Rosenthal, Thoma sau Türck. Prin colorare se face o diferențiere între celulele vii și moarte, numai cele moarte colorîndu-se. Se numără numai celulele vii (agregatele de celule se consideră o celulă). Numărarea trebuie să se facă imediat după adăugarea colorantului deoarece acesta acționează toxic. Este, în general, bine să se facă media din 2—3 numărători. După numărarea celulelor și prepararea concentrației optime de celule în mediul nutritiv, se trece la repartizarea în recipiente de cultură (eprubete, tuburi sau flacoane de cultură). Pentru a păstra omogenitatea suspensiei și a împiedica sedimentarea celulelor în timpul repartizării, suspensia este

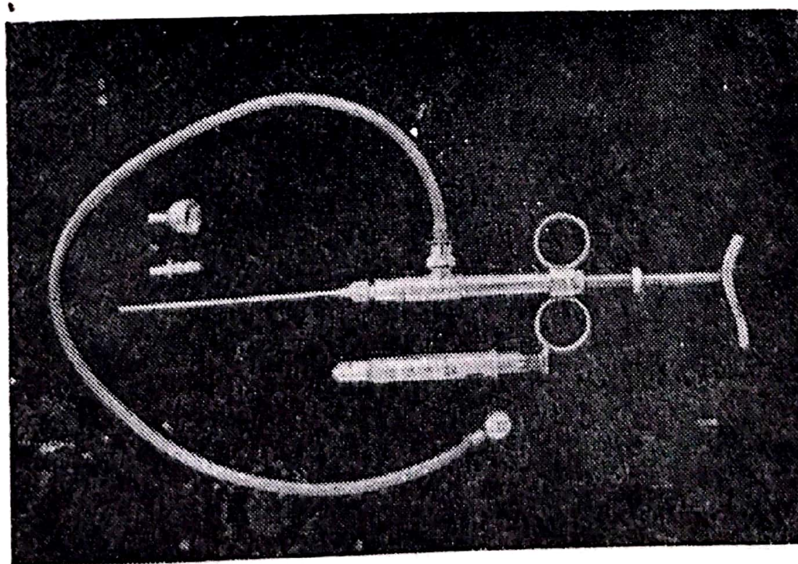


Fig. 72 — Seringă automată reglabilă pentru repartizarea lichidelor nutritive

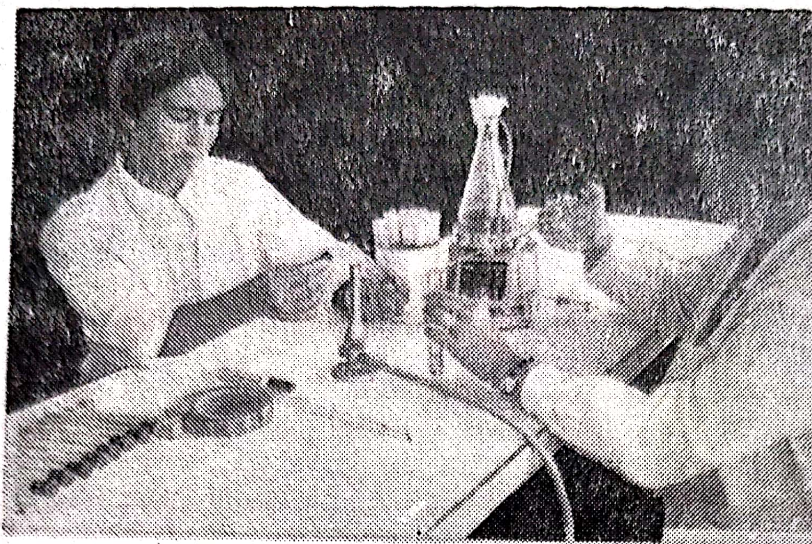


Fig. 73 — Repartizarea suspensiilor celulare cu ajutorul seringii automate

supusă unei agitații continue, cu ajutorul agitatorului magnetic, reglat la o turație redusă. Repartizarea se face cu o pipetă sterilă obișnuită, cu pipetă automată sau cu seringi automate. Numărul de celule care se inoculează în diferite vase de cultură este în funcție de suprafața de cultură a acestora. Ca regulă generală numărul de celule însămînțate este proporțional cu suprafața de cultură și invers proporțional cu dimensiunile celulei și cu puterea de multiplicare.

Vasele în care s-a repartizat suspensia celulară, sînt așezate la termostat la 37°C în poziția corespunzătoare, pentru ca celulele, prin sedimentare, să formeze un strat cît se poate mai uniform și prin multiplicare să realizeze cultura celulară dorită.

În cazul eprubetelor ele se așază în stative speciale (de lemn, material plastic sau metalice) care asigură o poziție înclinată în așa fel ca mediul să nu ajungă pînă la dop. Pe partea superioară a tubului se face un semn pentru ca după eventuale examinări sau mișcări ale tuburilor, ele să fie repuse în aceeași poziție.

Lichidele nutritive în care celulele se suspendă și care asigură necesarul energetic pentru creșterea și multiplicarea celulelor, sînt astfel alcătuite, încît să conțină toți principii de care ele au nevoie și un echilibru ionic care să asigure desfășurarea tuturor proceselor vitale în condiții normale.

Soluția Hanks se prepară și se livrează sub formă concentrată de 10 ori (10 ×):

NaCl	8,0 g
KCl	2,4 g
$CaCl_2$	0,14 g
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0,1 g
$MgCl_2$	0,1 g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$	0,06 g
KH_2PO_4	0,06 g
Glucoză	1,0 g
Roșu fenol	0,2 g
Apă bidistilată ad	1 000,0 ml

Ex tempore se diluează 1/10 în apă bidistilată sterilă. Pentru ajustarea pH-ului se folosește soluția de bicarbonat de sodiu 5% sterilă, adăugată în momentul diluării în cantitate de 5—10 ml (volumul soluției de bicarbonat de sodiu se scade din volumul apei).

Această soluție se poate folosi ca mediu de bază în numeroase alte formule de medii pentru culturi celulare, ca diluant pentru hidrolizat de lactalbumină, uneori pentru tripsină sau pentru spălarea și conservarea țesuturilor destinate culturilor celulare primare.

Soluția salină Earle se prepară și se livrează sub formă concentrată de 10 ori:

Soluția I:

NaCl	68,0 g
KCl	4,0 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,4 g
$NaHCO_3$	22,0 g
Glucoză	10,0 g
Roșu fenol	0,2 g
Apă bidistilată ad	1000,0 ml

Soluția II:

$CaCl_2$ anhidru	2,0 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	1,7 g
Apă bidistilată ad	1 000,0 ml

Soluțiile respective se conservă separat la +4°C, iar înainte de folosire se diluează: 100 ml soluție I + 700 ml apă bidistilată încălzită la 80°C timp de 20 minute, se amestecă după răcire cu 50 ml soluție II + 150 ml apă bidistilată, diluate separat.

Se mai folosesc mediile 199 (Morgan, Marton—Parker), mediul IC—65, mediul Eagle etc. Mediul inițial în care sînt însămînțate celulele este bine să aibă pH-ul 7, mai ales în cazul celulelor epiteliale. Formula cea mai simplă de mediu utilizată în culturile celulare este ser + soluție salină (Hanks sau Earle) + antibiotice. O formulă mai complexă și mai des folosită este: hidrolizat de lactalbumină 0,5%, ser de vițel 2%, soluție salină Hanks 97,5%, antibiotice (penicilină 100—200 U.I./ml, streptomicină 50—100 gamma /ml, stamicin 20—40 U.I. pe ml). Soluția salină Hanks ca și soluția Earle sînt astfel constituite încît să asigure echilibrul osmotic și deci un schimb normal de ioni între celulă și mediu. Schimbarea treptată a pH-ului, datorită proceselor metabolice pe care celulele le desfășoară, este indicată de roșul de fenol inclus în mediu și care virează culoarea și semnalează necesitatea împrospătării lui. Schimbarea mediului în aceste culturi se face după cca 3—5 zile, cînd mediul din roșu virează spre galben-portocaliu. Ea se efectuează cu pipete obișnuite sau, preferabil, cu seringi automate. În cazul culturilor în flacoane, după 24 de ore se face schimbarea mediului, pentru a elimina celulele moarte și resturile de hematii. În cazul culturilor în tuburi acest lucru nu este, de regulă, necesar.

Avînd asigurate condiții optime, fiecare celulă, sau grup de celule, constituie un mediu de multiplicare, un punct de plecare de la care, prin diviziunea celulară repetată, se obține în cîteva zile (1—8) un monostrat uniform, o „pajiște" sau „covor" de celule în care abia se mai disting nucleele inițiale.

Morfologia celulelor cultivate *in vitro* este relativ diferită de a celor aflate în țesuturile de origine, condițiile de creștere și sarcinile metabolice suferind anumite modificări. Celulele epiteliale, de exemplu, în culturile celulare iau o formă mai curînd poligonală, fiind denumite celule epiteloide *(epithellike cells)*. Fibroblastele sînt celule fusiforme sau cu un aspect neregulat, avînd proprietatea de a forma fibre. Celulele care, prin aspectul lor morfologic, se aseamănă cu fibroblastele se numesc fibroblastoide *(fibroblastlike cells)*.

În cazul culturilor cu creștere lentă este necesară împrospătarea mediului nutritiv. La culturile permanente această schimbare se face de obicei la 3 zile, iar la cele primare după 4—7 zile. Meticulozitatea efectuării tuturor operațiunilor de pregătire a culturilor ca și calitatea mediilor folosite sînt condiții primordiale pentru a obține culturi de calitate. Trebuie subliniat că tehnica preparării culturilor celulare este foarte pretențioasă. Neglijarea unor aspecte, uneori chiar neînsemnate în aparență, cum ar fi de exemplu calitatea apei sau a sticlăriei, poate să compromită total reușita întregii tehnologii.

Există și tehnici de obținere a monostratului celular pe întreaga suprafață a recipientului (prin rotație cu ajutorul unor dispozitive speciale) ca și culturi de celule în suspensie, prin care celulele sînt obligate, prin diferite procedee mecanice, să rămînă în suspensie și să se multiplice în toată masa mediului. Cultura staționară a luat însă cea mai largă folosire și datorită faptului că nu toate tulpinile de celule se pretează la cultivarea în suspensie.

Pentru întreținerea în laborator a liniilor celulare sau pentru efectuarea pasajelor succesive de celule neinoculate, se procedează de obicei la așa-numita versenizare (de la versen — sarea de sodiu a acidului etilendiamintetraacetic, denumit și EDTA, complexon III sau titriplex). În acest scop se înlătură lichidul nutritiv, se pune în loc o soluție sterilă de versen 0,02%, se incubează 30 de minute la 37°C, timp în care se realizează o bună dispersare a celulelor (se produce o separare a celulelor asemănătoare cu cea produsă de tripsină; spre deosebire de tripsină însă, versenul nu este nociv pentru celule, nici după un contact mai îndelungat — o oră. Suspensia de celule este apoi recoltată cu o pipetă Pasteur sterilă (după ce s-au făcut cîteva barbotări de omogenizare) și se trece într-o eprubetă de centrifugare sterilă. În cazul în care celulele sînt cultivate în vase mari, se poate introduce o bară magnetică sterilă, procesul de desfacere chimică fiind ajutat de agitația magnetică.

Sedimentul celular se resuspendă, după 1—2 spălări în SST, în lichid nutritiv și se repartizează în tuburi sau flacoane de centrifugă, la concentrație celulară optimă. În acest fel, se obține un nou pasaj, care se poate repeta de un număr variabil de ori, în funcție de linia celulară (în cazul celor permanente, practic indefinit).

Pentru a evita, în cazul folosirii culturilor de celule diploide, pierderea culturii primare de celule din care acestea provin, se poate recurge la păstrarea cîtorva tuburi în stare congelată, ca la nevoie să se poată apela la ele. În acest fel, se poate lucra cu aceeași linie diploidă ani de zile, cu condiția evitării contaminărilor microbiene. Pentru controlul proprietăților unei astfel de linii celulare se recomandă să se facă periodic analiza cromozomilor (numărul și morfologia lor).

Congelarea la —70°C este superioară prin folosirea unui conservant chimic (glicerol 15% sau dimetilsulfoxid 10% în mediu nutritiv). Acesta pătrunde rapid prin procesul de congelare în celule, inhibă, prin fixarea de apă, formarea de cristale intracelulare de gheață și se evită în acest fel alterarea celulelor.

Mai favorabilă este congelarea lentă, prin care, pînă la —20°C temperatura scade cu 1° pe minut, după care se scade pînă la temperatura dorită. Rata de supraviețuire în acest caz este de 30—100%, în timp ce în cazul congelării brușțe ea este mai mică cu 10—20%. În nici un caz, nu trebuie să se întrerupă procesul de congelare.

Temperatura de congelare de —70°C trebuie de asemenea respectată, variațiile (chiar între —50, —60°C) ducînd uneori la rapide pierderi ale viabilității.

Optimă s-a dovedit temperatura azotului lichid, la care rata de supraviețuire a celulelor este mai ridicată datorită absenței oricăror procese enzimatice.

Decongelarea se face rapid la baie de 37°C sub agitare ușoară. La suspensia de celule se adaugă apoi cca 5 ml de mediu nutritiv de creștere, se lasă 10—20 minute să stea la temperatura camerei și apoi se lasă să sedimenteze, se elimină supernatantul, se resuspendă celulele în mediu de creștere (concentrația de 200 000 celule pe ml mediu) și se repartizează în recipiente de cultură. Această tehnică se aplică în cazul conservării oricăror culturi celulare.

Evaluarea gradului de dezvoltare a culturilor în scopul stabilirii momentului optim pentru inoculare a materialului viral, se poate face prin metode morfologice (aprecierea suprafeței acoperite de monostratul celular, determinarea indicelui mitotic, numărarea directă a celulelor) și prin metode chimice (determinarea cantității de proteine celulare, a fosforului, a consumului de glucoză etc.). Cea mai expeditivă și mai larg folosită este aprecierea gradului de acoperire a suprafeței de creștere și a uniformității monostratului celular, prin examinare la microscop.

Folosirea culturilor celulare pentru izolarea și menținerea virusurilor trebuie să țină seama de un principiu enunțat de Levaditi încă în urmă cu peste 40 de ani și anume, că virusul trebuie cultivat *in vitro* pe același tip de țesut sau celulă pentru care are afinitate *in vivo*. Aceasta nu înseamnă însă cîtuși de puțin că el nu poate fi adaptat în timp, obținîndu-se cultivarea și pe alte tipuri de celule. Trebuie de asemenea să se sublinieze că utilizarea culturilor celulare nu poate și nu trebuie să înlocuiască tot arsenalul metodologic folosit pînă acum, respectiv folosirea animalelor de experiență, examenul serologic, examenul anatomo- și histopatologic, cel biochimic etc. Ea a permis obținerea unor date extrem de utile pentru cunoașterea virusurilor cum ar fi efectul citopatic, dinamica multiplicării virusurilor din celule, mecanismele de sinteză a elementelor structurale ale virusurilor etc. Ea a facilitat izolarea în stare pură a unor virusuri necunoscute și studierea caracterelor lor.

Contaminarea culturilor celulare

Contaminarea microbiană poate avea loc:
— prin infecții latente ale organelor supuse tripsinizării;
— prin contaminări secundare, în cursul recoltării țesuturilor;

— prin contaminări în cursul lucrărilor de prelucrare sau lipsa de sterilitate a unor adaosuri (mai ales serul de vițel).

În general, liniile celulare diploide contaminate trebuie să fie eliminate.

Prima dovadă a contaminării bacteriene este prezența în mediu a unor celule plutitoare, respectiv a detritusurilor celulare, după care se poate observa o tulburare a mediului și o modificare a culorii sale, datorită virajului indicatorului (mediul devine galben).

O problemă deosebită o reprezintă contaminarea cu micoplasme. Ele sînt mai frecvente în cazul liniilor permanente, contaminarea realizîndu-se în special prin aerosolii expulzați de om (de aceea este indicat ca în cursul lucrărilor să se folosească măștile de tifon care să acopere gura și nasul), dar și prin adaosuri contaminate (serul). Este vorba mai ales de *M. hominis* și *M. orale*. În cazul culturilor primare au fost semnalate *M. hyorhinis* (porc), *M. organi* și *M. laidlawi* (bovine).

Micoplasmele produc în culturile celulare uneori modificări celulare degenerative, asemănătoare cu efectele citopatice induse de virusuri, dar pot să se multiplice în culturi și fără a determina modificări celulare. În acest din urmă caz însă influențează procesul de multiplicare virală, pe care îl inhibă sau chiar îl opresc, ducînd la interpretări eronate.

Decelarea micoplasmelor se face prin însămînțări pe medii speciale (bulion PPLO) care se însămînțează cu sediment celular și după o incubație de 10 zile se pasează pe un mediu solid, citirea făcîndu-se după alte 10 zile de incubație.

Pentru debarasarea culturilor de micoplasme se pot folosi: Kanamicina (200 micrograme/ml), Neomicina (50 micrograme/ml), Gentamicina (200 micrograme/ml), Aureomicina (100 micrograme/ml). Celulele ce trebuie tratate se tripsinizează și sedimentul celular se reia într-un mediu de creștere care conține numai antibioticul corespunzător (nu și streptomicina sau penicilina). Suspensia se incubează cîteva zile pînă cînd se obține o multiplicare suficientă a celulelor. Apoi se face un nou pasaj. Tratamentul se repetă de 2—4 ori, după care se verifică dacă mai există micoplasme.

Contaminarea cu fungi duce chiar după cîteva pasaje la alterări celulare. Miceliile sînt ușor vizibile la microscop. Pentru tratarea culturilor contaminate se poate folosi Stamicina sau Amphotericina B în concentrație de 50—100 unități/ml respectiv 2—5 micrograme pe ml.

Contaminarea cu alte virusuri se poate decela prin tipul de efect citopatic, prin hemadsorbție, hemaglutinare, anticorpi fluorescenți etc.

Analiza cromozomială a culturilor celulare

Este necesară pentru caracterizarea liniilor celulare (diploide și heteroploide). Se folosesc în acest scop culturi pe lamelă, de 24—48 de ore, din care prin adăugare de colchicină, se obține o mitoză, ca urmare a acțiunii inhibante pe care aceasta o exercită asupra aparatului fusiform, astfel încît majoritatea celulelor se vor găsi în metafază (cu așezarea liniară a cromozomilor în zona ecuatorială). Supunînd apoi celulele unui șoc osmotic, prin tratare cu o soluție hipotonică, membranele celulare crapă și pun în libertate cromosomii. Aceștia se cercetează apoi după fixare, colorare și reprezentare fotografică.

Tehnică. Peste culturi de 24—48 de ore (lamele spălate cu PBS), se adaugă soluție de colchicină (2 mg Colcemid în 10 ml PBS) astfel încît concentrația finală să fie de 2—20 micrograme/ml. După o incubație de 3—10 ore la 37°C, se elimină lichidul și se fac două spălări cu PBS încălzit la 37°C. Stratul celular se dezlipește apoi cu ajutorul tripsinei sau cu un raclet de cauciuc steril și sedimentul spălat se reia în 1 ml soluție Hanks.

Se tratează apoi cu 5 ml apă bidistilată, adăugată picătură cu picătură (pH-ul ajustat la 7,2 cu amoniac). După o incubație de 30 minute la temperatura camerei, se face centrifugarea (800—1000 t/min.).

Urmează fixarea sedimentului celular cu 2—5 ml amestec de metanol 3 părți + acid acetic glacial 1 parte (proaspăt preparat), timp de 15—30 minute la +4°C (nu se va agita sedimentul) și se va repeta încă cel puțin o dată. După centrifugare, se elimină supernatantul pînă rămîn cca 0,5 ml și sedimentul celular se agită cu grijă.

Pentru a se obține o etalare optimă a cromozomilor pe un plan orizontal, suspensia celulară fixată se scurge pe o lamă răcită în prealabil la —20°C (se modifică tensiunea superficială și se schimbă brusc temperatura) și se usucă repede prin suflare și agitare. Citirea se face după incluzie cu balsam de Canada, la microscopul cu contrast de fază.

Se poate folosi și colorarea cu o soluție 2% orceină. În acest scop, preparatele cu suspensia celulară, uscate la aer, se acoperă pentru 30 minute cu soluția colorantă. Se face apoi diferențierea:

— 1 minut în alcool 70%
— 1 minut alcool 96%
— 1 minut în xilol.

Urmează incluzia în balsam de Canada. Citirea se face prin examen microscopic. Ea permite numai determinarea numărului de cromozomi. Pentru determinarea cariotipului este necesară fotografierea, urmată de decuparea fiecărui cromozom și așezarea în perechi care se lipesc pe hîrtie.

Inocularea culturilor celulare

Punerea în contact a materialului patologic suspect sau conținînd un virus cunoscut cu cultura celulară, se poate face în mod diferit, cele mai folosite metode fiind: metoda contactului cu țesuturi infectante, metoda fragmentelor de țesut infectate *in vitro*, metoda explantelor de țesut infectate *in vivo*, metoda înglobării suspensiei virulente în cultură etc.

În rutina majorității laboratoarelor de virusologie, se practică inocularea după cum urmează: se golesc de lichidul nutritiv tuburile conținînd cultura celulară și eventual se fac 1—2 spălări cu SST sau cu soluție Hanks, cu scopul înlăturării eventualilor anticorpi. În locul lichidului nutritiv, se introduce o cantitate variabilă, de 0,1—1 ml (în funcție de bogăția în virus), de suspensie de inoculat. Tuburile sau recipientele inoculate sînt incubate apoi la 36—37°C timp de o oră, timp în care se realizează contactul între virus și celulele gazdă. După o oră, în cele în care s-a introdus 0,1—0,5 ml inocul se adaugă lichidul nutritiv fără a îndepărta inoculul, în timp ce în cazul celor inoculate cu mai mult de 0,5 ml se procedează la îndepărtarea prealabilă a inoculului și numai după aceea se pune lichidul nutritiv de întreținere.

Dacă inocularea se face cu un material de cercetat ca suspensii de organe, de fecale sau urină, care adesea au efect citotoxic se recomandă ca, după adsorbţie, materialul inoculat să se elimine (prin pipetare), iar monostratul să se spele cu soluţie salină tamponată, şi numai după aceea să se adauge mediul de întreţinere. După 24 de ore, se poate face o schimbare a mediului.

Se poate face şi inocularea directă în tuburile de cultură peste mediul de întreţinere. În acest scop, se transferă în fiecare tub cîte 0,1—0,5 ml, în funcţie de concentraţia inoculului şi de capacitatea de multiplicare a virusului respectiv. Metoda se foloseşte mai ales în cazul pasajelor, în timp ce pentru izolări se preferă adsorbţia.

Culturile inoculate se pun apoi la incubaţie la 36,5—37°C, temperatură optimă pentru păstrarea unui metabolism normal al culturilor şi pentru sinteza optimă a virusurilor. Interpretarea rezultatelor se face după perioade variabile în funcţie de rapiditatea cu care se multiplică virusul, însă în mod obligatoriu culturile se vor examina zilnic pentru a urmări apariţia eventualelor modificări, ale monostratului sau al mediului nutritiv. Concomitent cu inocularea, este necesar să se facă şi controlul sterilităţii inoculului prin însămînţarea lui pe medii pentru germeni bacterieni. Dacă aceştia există în inoculum, se face inocularea unor noi tuburi de culturi celulare, mărind cantitatea de antibiotice sau fungistatice.

Citirea şi interpretarea rezultatelor

Prezenţa virusului în cultura celulară inoculată poate fi pusă în evidenţă prin mijloace directe şi indirecte. Metodele directe nu presupun evidenţierea nemijlocită a virusului, ci observarea unor modificări morfologice sau fiziologice ale substratului de celule, cauzate de multiplicarea virusului.

Unele metode sînt comune tuturor tipurilor de culturi celulare, altele sînt specifice unui singur tip. Aşa de exemplu, în timp ce virajul indicatorului roşu fenol este comun tuturor tipurilor de culturi ce folosesc medii cu acest indicator, hemadsorbţia şi hemaglutinarea sînt legate de anumite virusuri care au această însuşire.

Metode directe

1 — *Virajul indicatorului de pH (roşu fenol)* are loc ca o consecinţă a acidifierii mediului datorită acumulării de acid lactic, piruvic şi CO_2 în cursul catabolismului celular. Culoarea mediului se modifică de la roşu aprins spre galben-portocaliu. Rapiditatea cu care se produce virajul depinde de intensitatea proceselor metabolice şi de abundenţa celulelor. Culturile de tulpini celulare de origine tumorală modifică mediul mult mai rapid (48—72 de ore). În cazul unor virusuri, datorită multiplicării lor în celule şi în ultimă instanţă distrugerii acestora în cîteva ore, virajul mediului nu se produce după inoculare. În cazul altora (adenovirusuri), multiplicarea induce o glicoliză în celule şi acumularea de acizi organici, fapt care duce la o acidifiere mai puternică a mediului în comparaţie cu mediul culturilor neinoculate, în acest caz virarea spre galben denotă prezenţa virusului şi nu lipsa lui. Trebuie specificat însă că

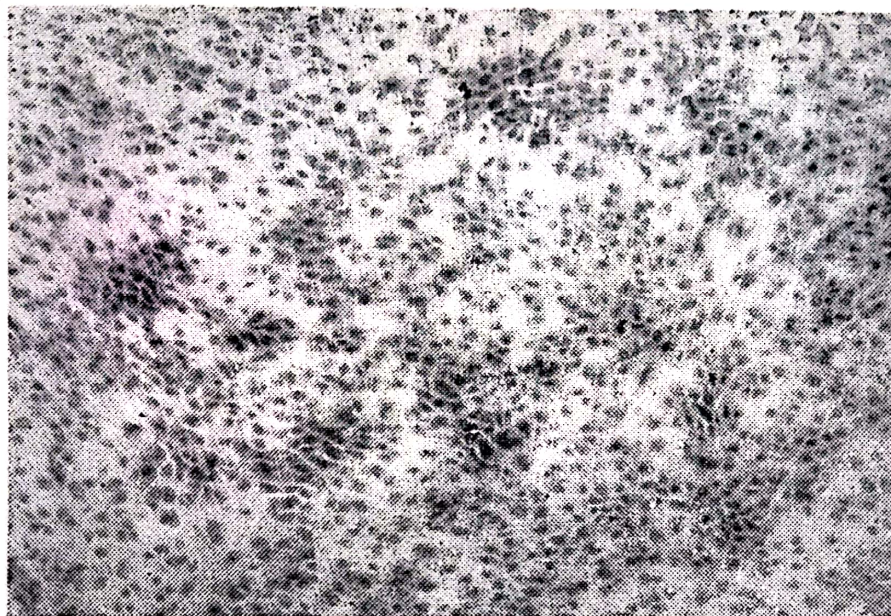


Fig. 74 — Cultură celulară de testicul de viţel neinoculată (×80)

există şi virusuri care, fie că sînt de la bun început în cantitate redusă în inocul, fie că se multiplică foarte lent, modifică mult mai lent culoarea mediului. Indicaţiile furnizate de această virare trebuie considerate deci ca relative.

2 — *Modificările morfologice — efectul citopatic.* Contactul unui virus cu celula din cultură poate îmbrăca aspecte cantitative şi calitative foarte variate, care se situează între areactivitatea totală şi distrugerea rapidă a celulei. Multiplicarea virusului se soldează cu modificări de ordin morfologic, mai mult sau mai puţin pronunţate ale celulei, cunoscute sub numele de efect citopatic. Nu toate virusurile care se cultivă în culturi ce-



Fig. 75 — Cultură celulară de rinichi de iepure neinoculată (×200)

lulare au o acţiune citopatogenă evidentă, iar caracterele efectului citopatic nu sînt identice la toate virusurile. Efectul citopatic este un indiciu important nu numai al demonstrării prezenţei virusului în cultură, ci adesea şi pentru clasificarea acestuia într-o anumită categorie. În principiu, efectul citopatic poate fi:

a — de tip degenerativ;
b — de tip degenerativ cu producere de incluzii;
c — de tip proliferativ;
d — de tip proliferativ cu producere de incluzii.

Modificările de tip degenerativ constau în micşorarea în volum a celulelor, cu tendinţa de rotunjire a lor, în apariţia de vacuole intracitoplasmatice, care, uneori, conferă citoplasmei un aspect spumos, în apariţia de granulaţii citoplasmatice, în timp ce nucleul devine şi el mai redus, dînd aspectul de picnoză, de obicei cu mărimea refringenţei sale.

Modificările de tip degenerativ, cu producerea de incluzii, sînt identice cu precedentele, doar că, în plus, apar nişte formaţiuni bine delimitate, de obicei oxifile, în număr variabil. Incluziile pot fi intracitoplasmatice, intranucleare sau simultan intranucleare şi intracitoplasmatice. Ele sînt formaţiuni oxifile de dimensiuni variabile (chiar peste 200 milimicroni), rotunde, ovale sau neregulate, adesea cu un halou în jurul lor. Astfel, virusurile rinopneumoniei ecvine, febrei catarale maligne, encefalomielitei aviare, virusul bolii lui Marek, produc incluzii intranucleare. Virusul pseudopestei aviare, virusul pestei bovine şi cel al turbării produc incluzii intracitoplasmatice, iar virusul jigodiei canine, atît intracitoplasmatice cît şi intranucleare.

Modificările de tip proliferativ constau în apariţia de celule voluminoase, rezultate de obicei în urma unei diviziuni nucleare neînsoţite de diviziunea citoplasmei. Iau naştere astfel celule gigante de tip sinciţial. Astfel, sînt modificările induse de virusul parainfluenţei.

În cazul modificărilor de tip proliferativ cu incluzii, iau naştere în plus incluzii intranucleare. Astfel, este virusul pojarului.

Observarea apariţiei efectului citopatic se face prin examinarea zilnică la microscop cu o mărire de 100—150 ori a culturilor inoculate. Intervalul de timp în care apare este variabil şi dependent de virusul în cauză şi bogăţia inoculului. Un inocul bogat în particule virale poate determina un efect citopatic evident în 24—36 ore, în timp ce unul sărac nu determină modificarea aparentă a celulelor nici după 7 zile. Unele virusuri determină apariţia unui efect citopatic numai după 1—3 treceri oarbe, în culturile de pasaj, timp necesar pentru adaptarea virusului la substratul celular. O trecere oarbă se face folosind cultura integrală (mediul şi celulele inoculate), preferabil după ce s-au făcut 2—3 îngheţări şi dezgheţări, pentru a elibera virusul din celule.

Aspectul culturii în care este vizibil un efect citopatic este variabil cu tulpina de virus, care-l determină. În acest sens cîteva exemple sînt edificatoare:

— Virusurile ECHO, coxackie A_9, B_1, B_5 produc un efect citopatic asemănător: în primele 12—18 ore apare o rotunjire a unora din celule, acestea apărînd de dimensiuni mai reduse, mai întunecate, cu nucleul mai puţin distinct, unele fiind transformate într-o masă mică, retractată, amorfă. În stadiile următoare, numărul acestor celule creşte progresiv, unele dintre ele desprinzîndu-se de pereţii vasului şi plutind în mediu.

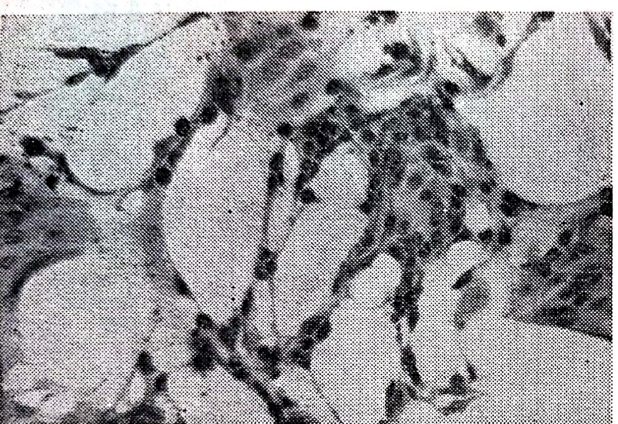


Fig. 76 — Rotunjiri celulare cu condensarea cromatinei nucleare și crearea de spații în monostrat — Adenovirus (×200)

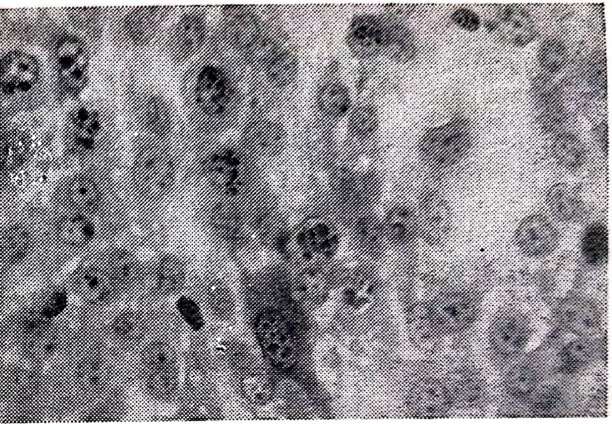


Fig. 77 — Incluzii intranucleare — Adenovirus (×400)

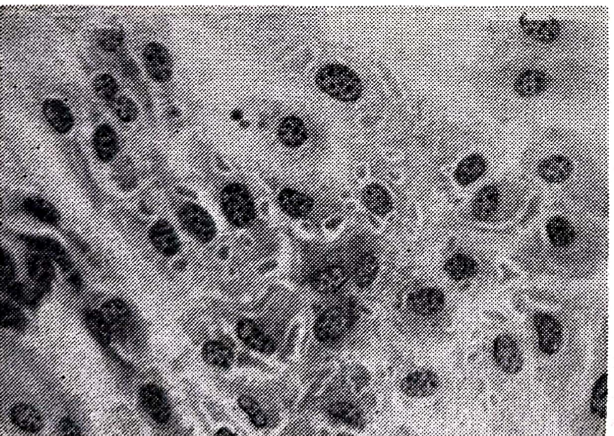


Fig. 78 — Incluzii intracitoplasmatice — virusul parainfluenței (×400)

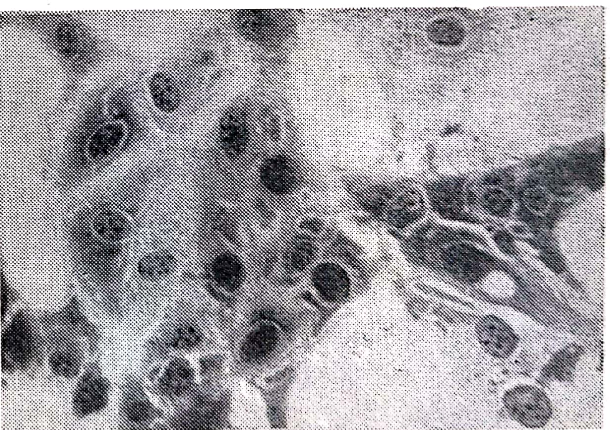


Fig. 79 — Incluzii intracitoplasmatice — virusul parainfluenței (×400)



Fig. 80 — Efect citopatic indus de virusul pseudopestei aviare (×80)

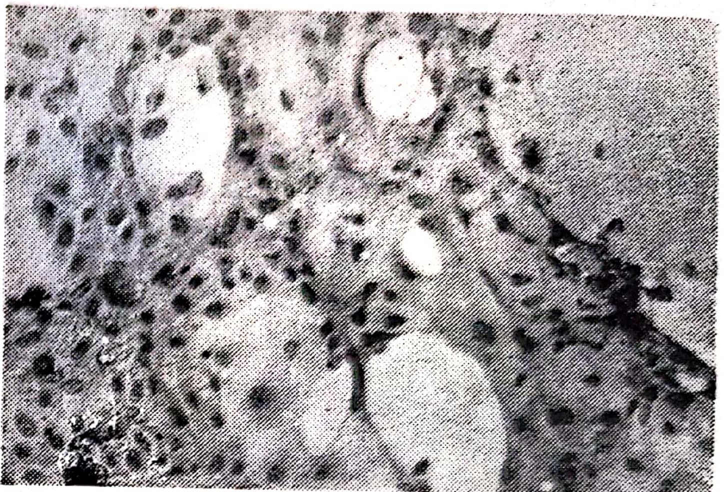


Fig. 81 — Efect citopatic indus de virusul stomatitei papuloase (×200)

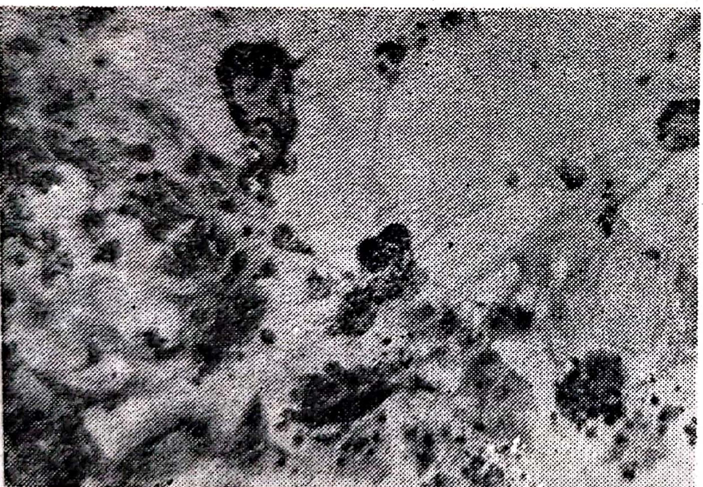


Fig. 82 — Efect citopatic indus de virusul variolei bovine (condensări şi fragmentări nucleare însoţite de sinciţializări şi distrugeri celulare) (×200)

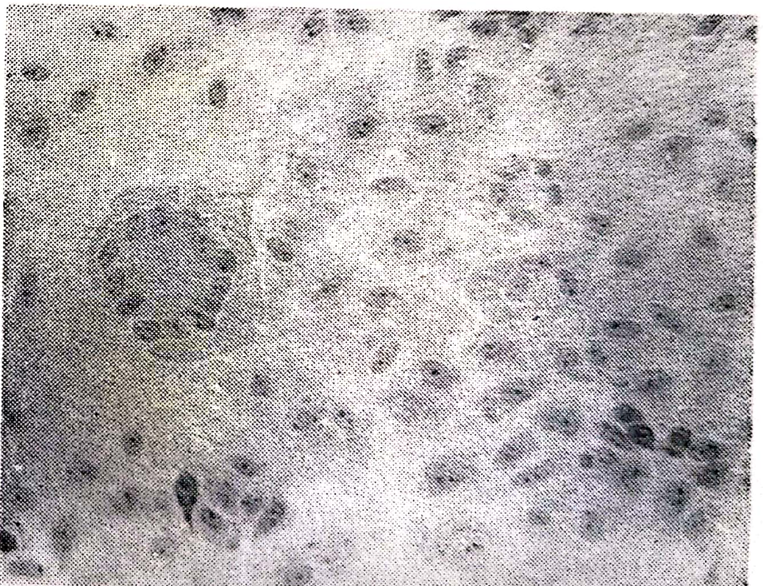


Fig. 83 — Efect citopatic indus de virusul jigodiei canine (formarea de celule gigante — ×400)

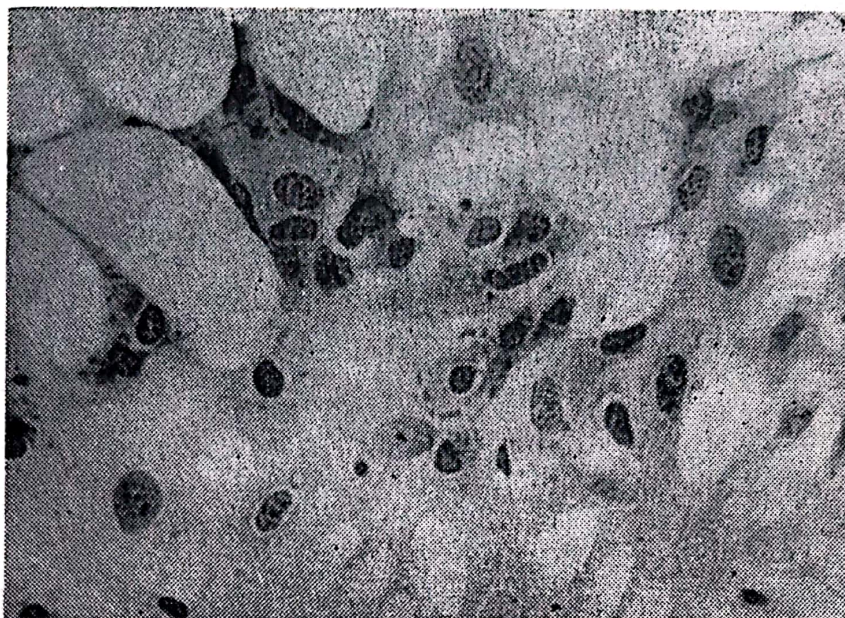


Fig. 84 — Efect citopatic indus de virusul mixomatozei iepurilor (fragmentări ale cromatinei nucleare, incluzii intracitoplasmatice, desprinderi de celule cu vacuolizări în monostrat; ×400)

în cele din urmă, din cultură nu mai rămîn decît rămășițe amorfe, resturi celulare sfărîmate, ce plutesc în mediul cu aspect turbid. În cazul culturilor de tip fibroblastic, se poate produce o desprindere în masă a pînzei celulare afectate.

— Adenovirusurile și virusurile herpetice produc un efect citopatic degenerativ de tip deosebit: celulele se rotunjesc, cîștigă în dimensiuni, mărindu-se de 1—2 ori, după care se adună în grupe celulare, formînd ciorchine, ce duc la destrămarea pînzei celulare și determină formarea de ochiuri mari, libere de celule, în colțurile cărora se situează grămezi celulare. În cele din urmă, celulele astfel modificate devin întunecate și multe se dezlipesc de pereți. Virusul herpetic produce în plus mase citoplasmatice întinse, în care se disting uneori nuclei (celule gigante).

— Virusul hepatitei contagioase a cîinilor produce în culturi celulare renale, testiculare, hepatice, de cîine dar și în unele culturi provenind de la alte specii (rinichi, pulmoni de porc, cobai, hamster și maimuță), începînd cu a doua zi de la inoculare, procese degenerative cu apariția de incluzii intranucleare. Cu ajutorul anticorpilor fluorescenți și al cercetărilor citochimice s-a stabilit că aceste incluzii conțin antigen viral în concentrații ridicate. Ele nu reprezintă altceva decît conglomerate de particule virale.

— Virusul bolii mucoaselor produce în culturile primare de rinichi sau testicul de vițel, focare cu celule avînd citoplasma vacuolizată, granulară sau condensată, iar nucleul puternic picnotic.

— Virusul parainfluenței bovine determină rotunjirea celulelor însoțită de formarea de sinciții, respectiv celule gigante. În celule, atît intracitoplasmatic cît și intranuclear, se găsesc incluzii oxifile.

— Virusul spumos al maimuțelor, virusul parotiditei epidemice și altele determină sincițializarea celulelor, manifestată prin formarea de mase citoplasmatice multinucleate, rezultate din contopirea mai multor

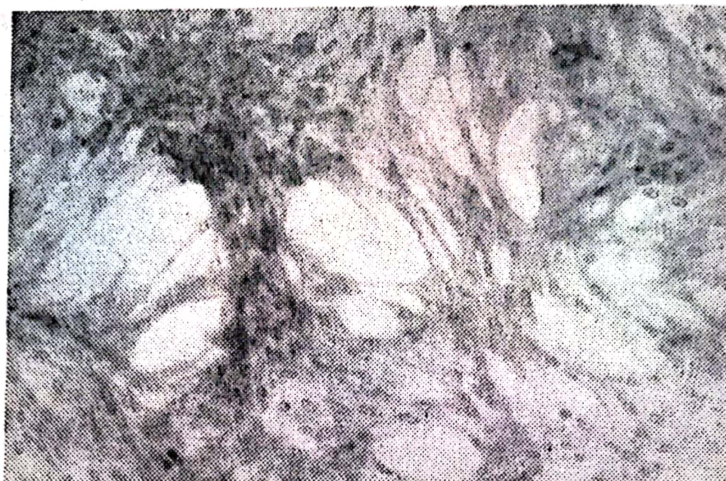


Fig. 85 — Efect citopatic indus de mixovirus (×80)

celule sau din multiplicarea nucleară neînsoţită de clivaj citoplasmatic. Pe lîngă aceste sinciţii giganto-celulare se formează şi grămezi amorfe, de aspect întunecat, înconjurate de zone libere, lipsite de celule.

Alte virusuri (vaccinal) produc efecte citopatice de aspect mixt în care se întîlnesc toate 3 tipurile de fenomene. Capacitatea citopatogenă este variabilă chiar în cadrul aceleiaşi specii de virus, cu tulpina şi chiar cu condiţiile de cultivare. Efectul citopatic reprezintă totuşi mijlocul cel mai rapid şi expeditiv de orientare în diagnostic.

Modificările monostratului celular, ca urmare a multiplicării virusurilor, trebuie diferenţiate de modificările ce se pot produce datorită fenomenelor de îmbătrînire a celulelor sau efectului citotoxic al unor componente din mediul nutritiv (serul, unele ingrediente impure etc.).

Punerea în evidenţă a modificărilor morfologice din culturile celulare. Examinarea preparatelor native sau direct a tuburilor de cultură

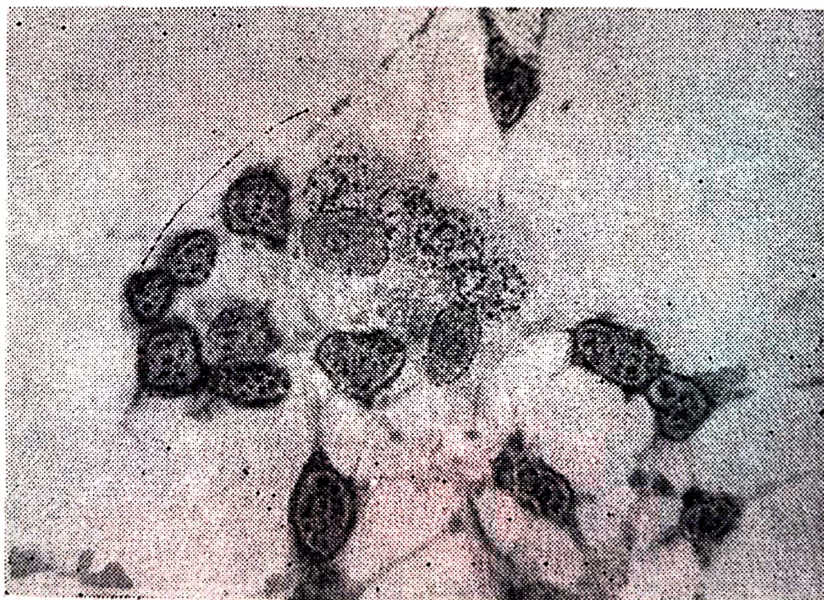


Fig. 86 — Efect citopatic indus de virusul bolii lui Aujeszky (crearea de spaţii în monostrat, condensări şi pulverizări ale cromatinei nucleare; ×400)

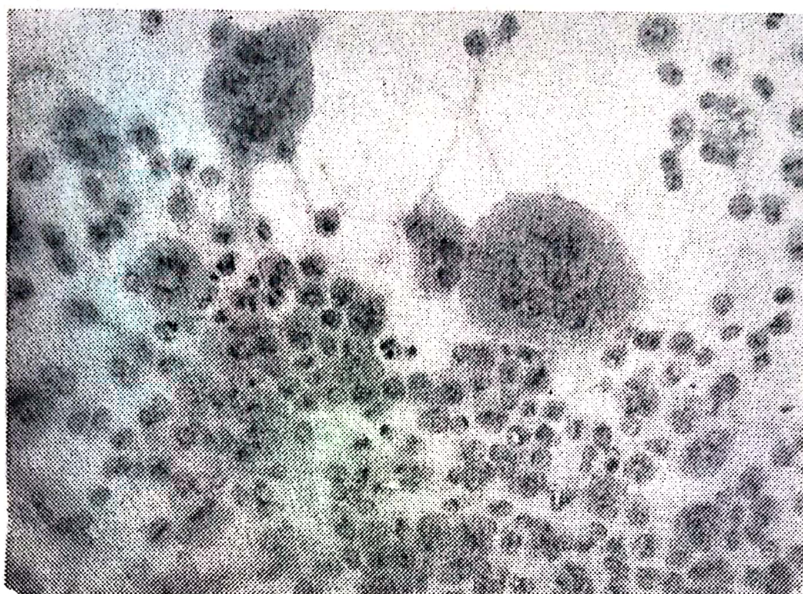


Fig. 87 — Efect citopatic indus de virusul bolii lui Aujeszky (sinciţializări cu formarea de celule gigante, condensări ale cromatinei nucleare, crearea de spaţii în monostrat; ×200)

permite observarea unor modificări cum ar fi rotunjirea celulelor, apariţia lacunelor în monostratul celular, desprinderea celulelor de pe pereţii vasului, dar pentru a cerceta mai îndeaproape alteraţiile citoplasmatice şi nucleare care survin în cursul interacţiunii dintre virus şi celula gazdă, sînt preferate metodele de colorare.

O metodă care oferă rezultate foarte bune este următoarea:

— se varsă lichidul nutritiv din tubul de cultură şi se toarnă alcool metilic în cantitate suficientă pentru a acoperi toată cultura (2—3 ml); se lasă în contact cîteva minute în poziţie înclinată;

— se îndepărtează alcoolul metilic şi se spală tubul cu acetonă;

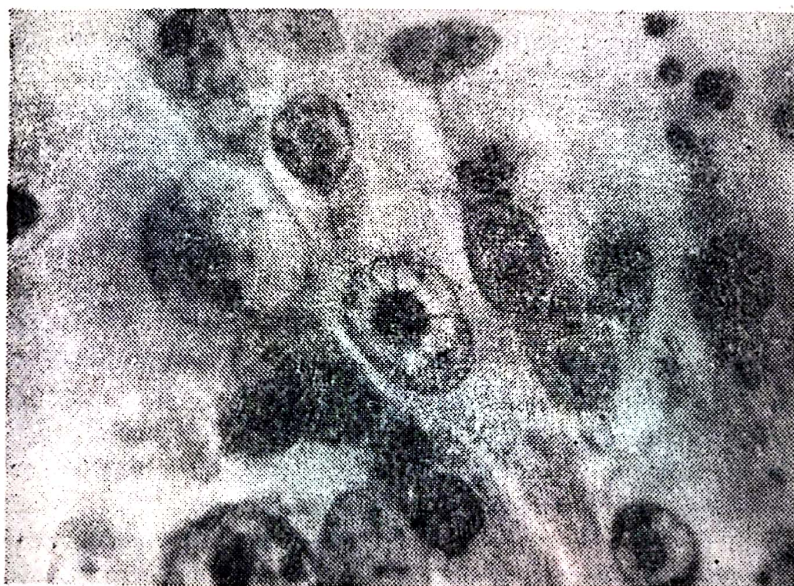


Fig. 88 — Modificări nucleare induse de adenovirus (condensări şi fragmentări ale cromatinei nucleare, picnoze; ×400)



Fig. 89 — Efect citopatic indus de herpes virus — conjunctivă de bovine (pulverizări ale cromatinei nucleare; ×900)

— imediat după tratarea cu acetonă (în așa fel ca cultura să nu se usuce), se tratează cu amestec de alcool etilic absolut și eter (în proporții egale), în cantitate de 4—5 ml pentru o eprubetă; se lasă 5—10 minute în repaus după care se înlătură;

— se toarnă apoi, tot înainte de a se usca cultura, o soluție de 8% în alcool și eter, celoidină (4—5 ml) și se omogenizează pe tot peretele eprubetei în așa fel încît să formeze un strat uniform;

— excesul se înlătură;

— se răsucește eprubeta (fără dop) cîteva minute pentru ca stratul de celoidină să fie cît mai uniform și apoi se pune cu gura în jos pentru a se usca complet (timp de 20 minute); se toarnă apoi în eprubetă apă distilată, ca pelicula de celoidină să nu devină fragilă;

— cu o pensă se desprinde pelicula de celoidină de pe pereții eprubetei, aceasta antrenînd totodată și stratul de celule; în final pelicula va avea aspectul unui sac transparent și moale; se taie partea laterală și cea inferioară cu o foarfecă și se lipește foița ce rezultă pe o lamă de microscop curată, pe care în prealabil s-a pus puțină apă distilată; lipirea se face cu partea care a aderat la peretele eprubetei; apa de pe lamă ușurează întinderea perfectă a peliculei; cu o sugativă se usucă excesul de apă;

— se pun apoi, cu o baghetă, cîteva picături de *oleum cariophili*, întinzîndu-se uniform cu degetul pelicula de celoidină. Acesta are rolul de a fixa bine monostratul de lamă;

— urmează 3 băi de alcool absolut și eter în părți egale în care se lasă 10—20 minute pentru dizolvarea stratului de celoidină;

— se trece apoi preparatul într-o baie de alcool 76° timp de 5—10 minute, după care urmează o baie de apă distilată (20 minute) și colorarea.

Colorarea se face de preferință bicromic:

— hematoxilină — 10 minute

— apă de robinet pînă la virarea spre albăstrui a monostratului celular

— eozină 1—2 minute, urmată de clătire în apă distilată

— o baie de alcool 70° urmată de 4 băi de alcool 96°

— o baie de xilol

— montare în balsam de Canada

— examinare la microscop.

Se poate face colorarea şi direct în tubul de cultură. În acest scop, se face întîi fixarea cu formol 1/4 timp de 24 ore. Se spală apoi cu apă distilată şi se colorează bicromic:

— hematoxilină 10—30 minute

— spălare cu apă de robinet 15—30 minute

— eozină 5 minute

— spălare în apă distilată

— spălare în alcool 96°

— baie de alcool absolut 10 minute

— baie de alcool + xilol (circa o oră)

— montare în balsam de Canada.

Nucleii vor apărea coloraţi în albastru-închis, iar citoplasma în roz-violet.

După altă tehnică, pentru a colora monostratul celular în care urmează să se cerceteze modificările antrenate de dezvoltarea virusurilor, se recurge la cultivarea acestora în tuburi speciale de cultură cunoscute sub numele de tuburi Barski sau Leighton. Acestea au partea inferioară modificată, dispunînd de un perete plat pe o lungime de cca 3,5 cm. În aceste eprubete, se introduce de la bun început o lamelă de sticlă, care va ocupa în cursul dezvoltării monostratului partea aplatizată a tubului, constituind suportul de dezvoltare al acestuia. În momentul cînd cultura este dezvoltată suficient, se inoculează întocmai ca şi în cazul celorlalte tuburi şi se urmăreşte apariţia modificărilor celulelor antrenate de virus.

În vederea colorării se procedează în felul următor:

— se decantează lichidul de cultură din tub, se înlocuieşte cu soluţie fiziologică, se pune 10 minute la termostat;

— se aruncă soluţia fiziologică şi se pune în loc fixatorul Dubosq sau un amestec, în părţi egale, de alcool absolut şi eter, menţinîndu-se 24 de ore;

— se aruncă amestecul de alcool şi eter, înlocuindu-se după 10—15 minute cu alcool 80°, care, la rîndul lui, se înlocuieşte după 10 minute cu alcool 70°, apoi cu alcool 60° şi în fine alcool 50°;

— după ce se aruncă ultimul alcool de spălare, lamela se desprinde şi se scoate din tub;

— se introduce în hematoxilină diluată (7 picături hematoxilină de bază la 10 ml apă distilată) şi se ţine timp de 24 de ore, sau hematoxilină în soluţie concentrată (de bază), în care se ţine 5 minute;

— spălare cu apă distilată;

— baie de alcool acidulat, pînă ce culoarea monostratului devine roz-pal (alcoolul acidulat se prepară din 100 ml alcool 70° + 1 ml acid clorhidric p.a. normal; înainte de folosire din această soluţie se prepară soluţia de lucru, amestecînd o parte soluţie de bază cu 2 părţi alcool 80°);

— baie cu apă amoniacală, timp de 3—4 minute, după care culoarea virează uşor spre albastru (apa amoniacală se prepară din 100 ml apă de robinet la care se adaugă 5 picături de amoniac; din această soluţie de bază, se prepară soluţia de lucru, prin amestecarea cu două părţi de apă de robinet);

— baie cu apă de robinet timp de 6 minute;

— baie cu eozină timp de 30 secunde;

— 3 băi de alcool 96°, în care se trece foarte rapid;

— baie de alcool absolut;

— baie de alcool + xilol ($\overline{aa}$);

— xilol;

— montare pe lamă curată în balsam de Canada.

3 — *Formarea de plaje sub agar.* În studiul efectului citopatic al diferitelor virusuri s-a observat că dacă inoculul virulent este foarte diluat, efectul citopatic în mediile lichide se produce în salturi. Cele cîteva celule infectate iniţial vor elibera o cantitate de particule virale care vor infecta alte celule, fie prin intermediul mediului nutritiv, fie prin contiguitate, uşurînd în acest fel o nouă fază de sinteză a virusului, soldată cu punerea în libertate a unei noi cantităţi de virus care va infecta restul celulelor. Dacă se întrerupe posibilitatea ca celulele rămase intacte la un anumit moment dat să fie infectate de către corpusculii virali prin intermediul lichidului de cultură, acoperind cultura, imediat după inoculare, cu un strat de agar nutritiv special, focarele de degenerare vor fi localizate şi evoluţia lor se va face în continuare numai din aproape în aproape. Celulele din aceste focare, degenerate în urma acţiunii virusului, îşi pierd proprietatea de a fixa un colorant vital ca roşul neutru, înglobat în agar sau adăugat ulterior şi, în acest fel, vor apărea aşa-numitele „plaje", de aspect translucid, necolorate. Fenomenul a fost descoperit de D u l b e c c o în 1952.

Tehnica constă în următoarele:

— se decantează mediul de pe monostratul complet format în flacoane de 85 ml. Se spală de 3 ori cu soluţie SST (cîte 2 ml);

— se prepară diluţii zecimale în SST şi se însămînţează fiecare flacon cu cîte 0,5 ml suspensie virală;

— se incubează o oră la 37°C pentru absorbţie;

— se amestecă 15 ml mediu cu 20% ser de cal în SST sau în mediu de întreţinere conţinînd 0,004% roşu neutru, cu un volum egal de agar 3% în SST (agaroza) topit prin încălzire la 100°C şi răcit înainte de amestec la 43°C;

— se acoperă rapid monostratul cu 4 ml din amestecul de agaroză şi se lasă să se solidifice perfect orizontal;

— se inversează flaconul şi se incubează la 37°C;

— se examinează zilnic în lumină oblică pe un fond alb sau verzui-deschis.

După aspectul şi timpul de apariţie a plajelor în agar se pot trage o serie de concluzii foarte utile pentru precizarea diagnosticului. În timp ce unele virusuri (poliomielitic, coxsackie) determină apariţia relativ precoce (în 2—3 zile) a plajelor, acestea avînd un contur rotund, bine delimitat, diferitele tipuri de virus ECHO produc plaje mai tardiv (după 3—10 zile), unele cu margini difuze, din cauza persistenţei unor celule normale.

Metoda are aplicaţii deosebit de utile în studiile de genetică virală; ea permite izolarea de linii pure de virus, pornind de la o singură „colonie“ care este generată, cel puţin teoretic, de către o singură particulă virală. De asemenea, ea se foloseşte în operaţiunile de titrare a concentraţiei virusurilor în diferite suspensii virale.

Ea se foloseşte şi în izolarea unor tulpini virale cu însuşiri particulare. Astfel, în cazul virusului Aujeszky s-a observat că tulpinile generatoare de plaje mici, deci care au o capacitate de „difuziune“ lentă în monostratul celular, sînt dotate cu însuşiri de patogenitate redusă, fără a-şi modifica însă valoarea antigenică. Izolarea unor astfel de tulpini a stat la baza preparării virus-vaccinului antiaujeszky viu care se foloseşte în unele ţări cu rezultate foarte bune.

Metode indirecte

1 — *Testul de hemadsorbţie.* Spre deosebire de virusurile care provoacă efectul citopatic în culturile celulare, există şi virusuri care, nu produc un efect vizibil, deci prezenţa lor nu se poate stabili pe baza acestuia. Constatîndu-se că unele virusuri au capacitatea de a determina celulele în care se dezvoltă, de a adsorbi la suprafaţa lor hematiile dintr-o suspensie ce se adaugă în tubul de cultură, s-a imaginat testul de hemadsorbţie. Fenomenul este vizibil la microscop şi poate fi inhibat în mod specific prin serul imun corespunzător. Se pot folosi hematii de cobai, iepuri, oaie, om (grup 0) etc. În acest scop se adaugă în tubul de cultură, fie că apare sau nu efectul citopatic, o suspensie de hematii 0,4% spălate temeinic. După 3—5 minute, examinarea la microscop permite constatarea prezenţei hemadsorbţiei în cazul cînd în cultură s-a dezvoltat virusul avînd această însuşire. În stadii avansate cînd hemadsorbţia este totală, hematiile tapisează tot stratul de celule, totodată observîndu-se grămezi aglutinate care plutesc libere în mediu. Spre deosebire de efectul citopatic care nu apare constant la primul pasaj, acesta apare întotdeauna dacă este vorba de un virus hemadsorbant. Exemple de virusuri hemadsorbante sînt virusul Newcastle, al influenţei, al parainfluenţei, al oreionului, ECHO 10.

2 — *Testul de viabilitate.* Presupune determinarea capacităţii de proliferare a celulelor puse în contact cu un virus, în condiţii propice de multiplicare. Metoda este mai puţin folosită.

3 — *Testul de coalescenţă* se bazează pe constatarea că două fragmente de ţesut viabil puse în contact strîns într-un mediu nutritiv formează prin proliferarea celulelor, o singură masă — fenomen numit coalescenţă. Celulele care au fost infectate nu mai realizează contopirea. Metoda este greoaie. S-a folosit în cazul virusului encefalomielitei ecvine de vest.

4 — *Interferenţa* se bazează pe acţiunea antagonică dintre două virusuri, dintre care unul (virusul interferent) conferă celulei gazdă proprietatea de a nu fi receptivă faţă de un al doilea virus. De obicei foloseşte în sistem un virus hemadsorbant pentru a uşura punerea în evidenţă a fenomenului de interferenţă.

5 — *Testele biochimice* presupun punerea în evidenţă a diminuării sau creşterii cantităţii unor compuşi celulari sau ai mediului, ca urmare a cultivării unui virus. Astfel, sînt consumul de glucoză, modificările proteinelor celulare etc.

Inocularea ouălor embrionate de găină

Folosirea ouălor embrionate a luat o extindere mare, în special după 1930, cînd GOODPASTURE a semnalat valoarea acestei metode pentru izolarea virusurilor. Pentru izolarea primară a unor virusuri, inocularea pe ouă embrionate este cea mai sensibilă metodă. De asemenea, se foloseşte larg în prepararea unor antigene cu titruri ridicate ca şi a unor vaccinuri. Avantajele constau în următoarele:

— se manipulează uşor;

— nu ocupă spaţiu mare;

— fluidele şi membranele embrionare furnizează cantităţi mari de material virulent;

— în embrioni nu se formează, după inoculare, anticorpi faţă de agentul inoculat;

— lichidele embrionare sînt relativ libere de proteine, pretîndu-se pentru obţinerea de vaccinuri.

Dezavantaje:

— ouăle pot conţine unii agenţi virali sau bacterieni transmişi de la păsările adulte (virusul leucozei, virusul encefalomielitei aviare, pseudopestei aviare, agentul ornitozei, micoplasme). Prezenţa lor în stare latentă poate produce interferenţă care denaturează rezultatele inoculărilor;

— ouăle provenite de la păsări tratate cu antibiotice din grupul tetraciclinelor pot condiţiona o rezistenţă a embrionilor respectivi mai ales faţă de unele rickettsii şi chlamidii.

Embrionii de găină în primele 10 zile de incubaţie au nivelul metabolic cel mai ridicat, din cauza proliferării celulare intense, iar ţesuturile nefiind diferenţiate, susceptibilitatea la infecţie este uniformă. Proliferarea virusului atinge şi ea rate înalte în aceste stadii. Între a 10-a şi a 15-a zi, metabolismul embrionului scade, iar diferenţierea ţesuturilor atrage după sine şi o susceptibilitate selectivă a lor, cu producerea de leziuni tipice. În stadiul final, embrionul primeşte o rezistenţă nativă faţă de agenţii care nu sînt în mod obişnuit patogeni pentru specia respectivă.

Condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească ouăle care urmează să fie folosite pentru inoculări:

— să fie libere de virusurile pseudopestei aviare, encefalomielitei, bronşitei infecţioase, leucozei, bolii lui Marek, de micoplasme sau diferite bacterii (*Salmonella pullorum* de exemplu);

— să provină de la găini care nu au fost tratate cu tetracicline;

— să fie incubate în condiţii corespunzătoare (37°C, cu 40—70% umiditate) şi să fie asigurată mişcarea lor periodică prin schimbarea poziţiei cu scopul de a preveni aderenţele membranelor.

Căile de inoculare diferă cu natura agentului viral ce urmează a fi inoculate şi cu scopul în care se inoculează (izolarea primară, preparare de antigeni virali, determinarea capacităţii infective etc.).

Înainte de inoculare ouăle se mirează, notîndu-se cu creionul pe coajă, poziţia embrionului şi nivelul camerei de aer. Apoi ele se transportă în boxa sterilă, se aşază pe stative speciale, care să permită orientarea lor în poziţia dorită, avîndu-se grijă ca pentru fiecare probă să existe mai multe ouă (în general 5). Se badijonează porţiunea cores-

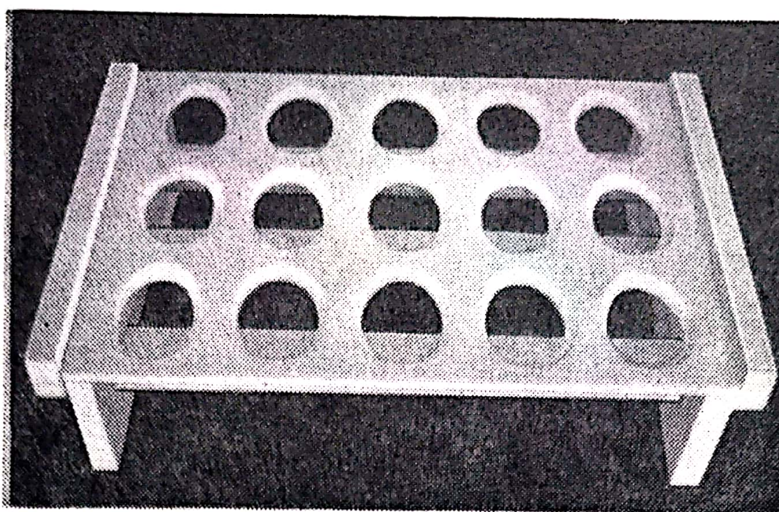


Fig. 90 — Stativ pentru ouă

punzătoare camerei de aer cu un tampon cu tinctură de iod şi se lasă să se usuce, după care urmează inocularea. Aceasta se face cu ace şi seringi sterilizate prin fierbere.

1 — *Calea corioalantoidiană* (metoda Burnet) se foloseşte mai des pentru virusurile grupei pox (variolice), unele herpes-virusuri şi virusul Newcastle, care produc leziuni caracteristice pe membrana corioalantoidiană. Se pretează foarte bine pentru determinări cantitative.

Dacă unele virusuri, cum sînt cel al variolei aviare, virusul laringotraheitei aviare, al bolii lui Aujeszky, al mixomatozei, al sarcomului Rous, provoacă leziuni sub forma unor focare vizibile macroscopic, altele provoacă leziuni foarte discrete (virusul influenţei A şi B), iar altele, deşi se multiplică, nu provoacă modificări decelabile macroscopic (virusul rabic, al coriomeningitei limfocitare etc.).

La embrionii de 10—11 zile se marchează prin ovoscopie locul cel mai puţin vascularizat, în apropierea sacului de aer (de obicei este în partea opusă embrionului). Oul se fixează într-un stativ cu partea marcată în sus şi se badijonează cu tinctură de iod suprafaţa respectivă

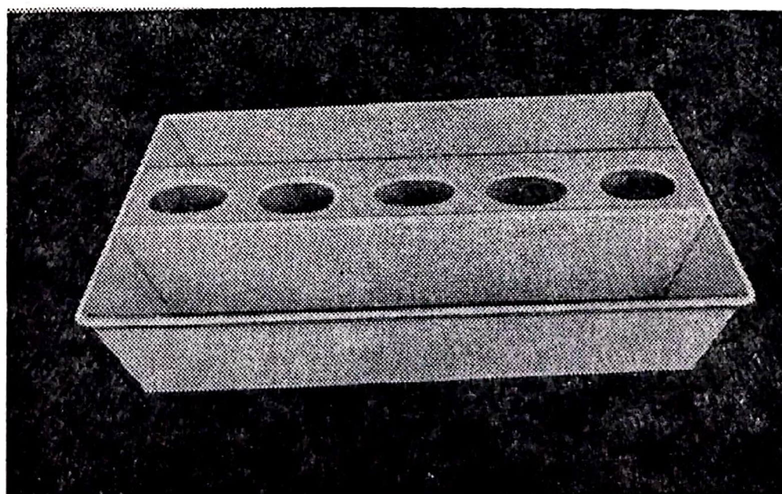


Fig. 91 — Tavă pentru deschiderea ouălor incubate

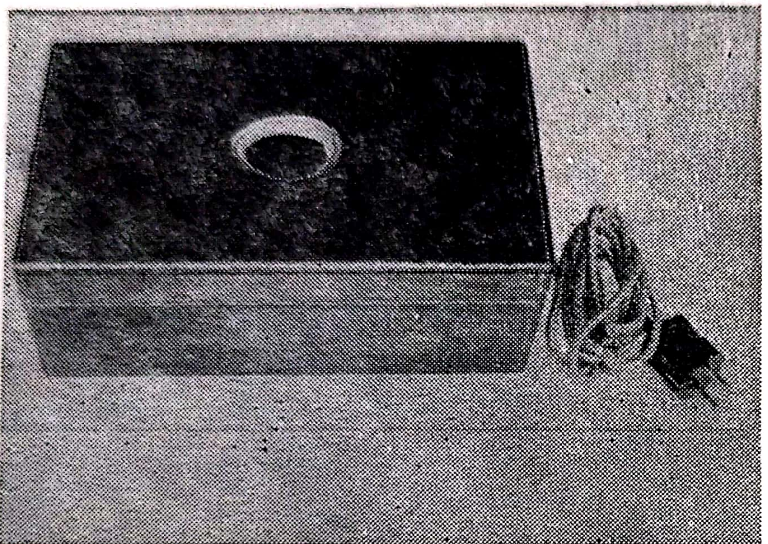


Fig. 92 — Ovoscop

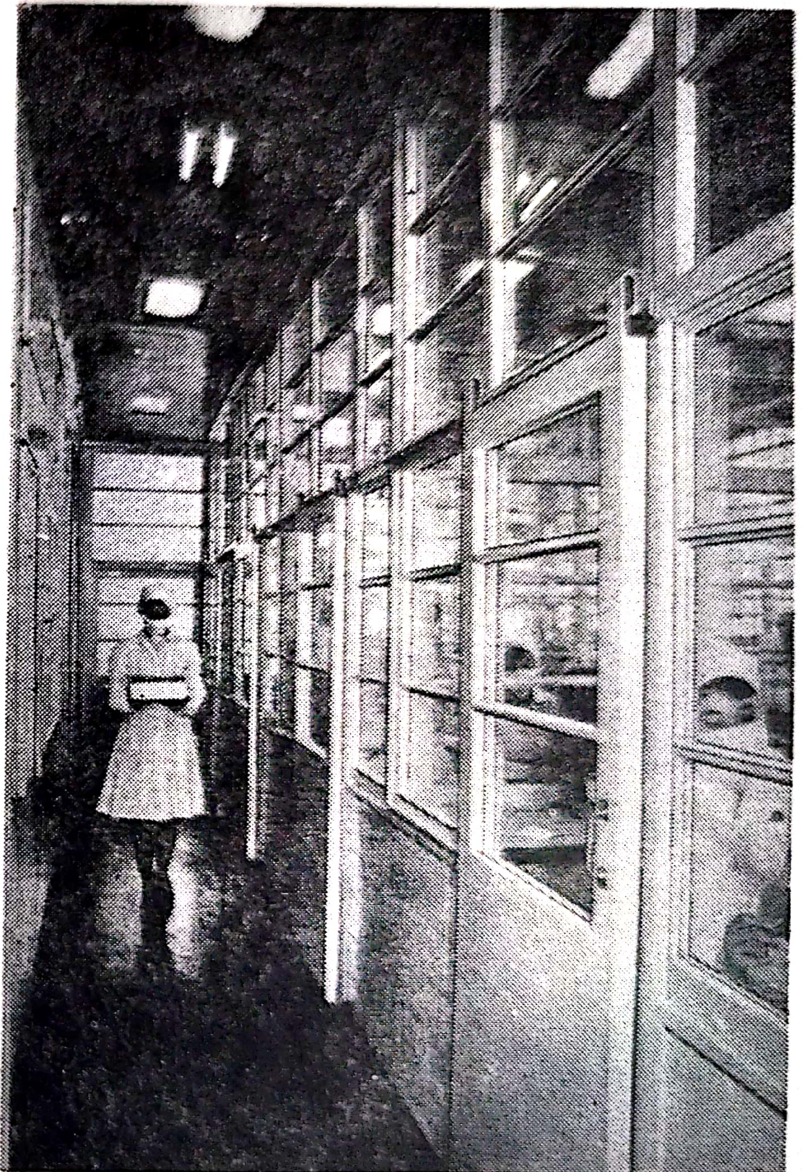


Fig. 93 — Boxe sterile pentru inoculări

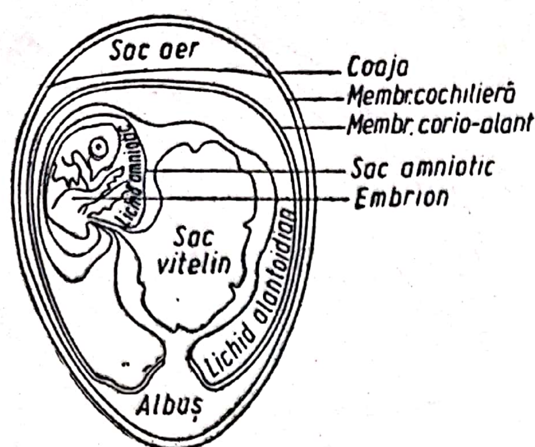


Fig. 94 — **Schema componentelor oului embrionat de găină**

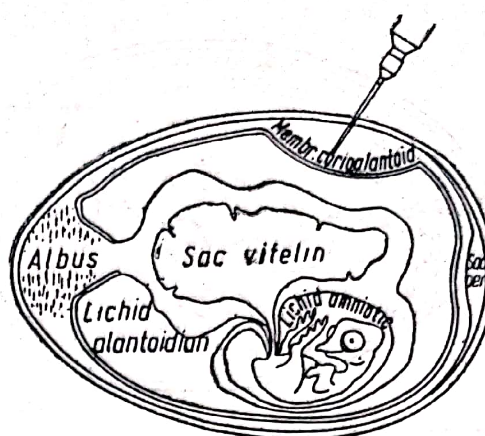


Fig. 95 — **Inocularea în membrana corioalantoidiană a oului embrionat de găină**

și o parte din aceea corespunzătoare camerei cu aer. Cu un dispozitiv special, de tipul frezei dentare, se perforează coaja în dreptul camerei de aer. Cu aceeași freză, la care se adaptează un disc de carborund, se creează la nivelul marcajului un orificiu dreptunghiular cu dimensiunile de 3/6 mm în coaja oului, în lungul axului mare al acestuia. Se va avea grijă ca membrana cochilieră să nu fie perforată. Prin evacuarea aerului din camera de aer, se creează o depresiune (un fals sac cu aer) la nivelul „ferestrei", unde cu ajutorul unei seringi se va depune inoculul (0,1 ml), prin perforarea membranei cochiliere pe o distanță de cca 6 mm (nu însă și a celei corioalantoidiene). Cele două orificii se etanșeizează apoi cu ajutorul parafinei sau colodiului (în cazul ferestrei se aplică o lamelă de microscop și parafină sau colodiu pe margini). Incubația se face în poziție orizontală la 35°C timp de 48—72 de ore.

Înainte de recoltarea membranei corioalantoidiene, se face ovoscopia pentru a vedea dacă camera de aer mai este sau nu deplasată. Dacă nu, se face o ușoară aspirație la nivelul orificiului camerei de aer. Locul din dreptul falsului sac de aer se badijonează cu tinctură de iod după care se sparge coaja și membrana cochilieră cu ajutorul unei foarfeci și se îndepărtează, expunîndu-se membrana corioalantoidiană pe o suprafață cît mai mare. Porțiunile de membrană prezentînd leziuni specifice se prelevează în recipiente sterile pentru examinări ulterioare.

2 — *Calea alantoidiană* se folosește pentru pasajul virusurilor, pentru producerea de cantități mari de virus, pentru reacțiile serologice și pentru prepararea vaccinurilor. Virusul proliferează în celulele endodermice ale membranei corioalantoidiene și este eliberat în cantități mari în fluidul cavității alantoidiene.

Ouăle embrionate de 10—11 zile sînt marcate în locul unde se află embrionul și camera de aer, punctul de inoculare fiind în partea opusă embrionului, la limita sacului cu aer, într-o zonă unde vascularizația este mai puțin intensă. După perforarea cojii oului și dezinfecția de rigoare, se străpunge cu acul adaptat la seringă și orientat în direcție paralelă cu axul lung al oului pe o distanță de circa 13 mm membrana cochilieră și corioalantoidiană, inoculîndu-se 0,1—0,2 ml în cavitatea alantoidiană. După parafinarea orificiului, ouăle se pun din nou la incubație și se

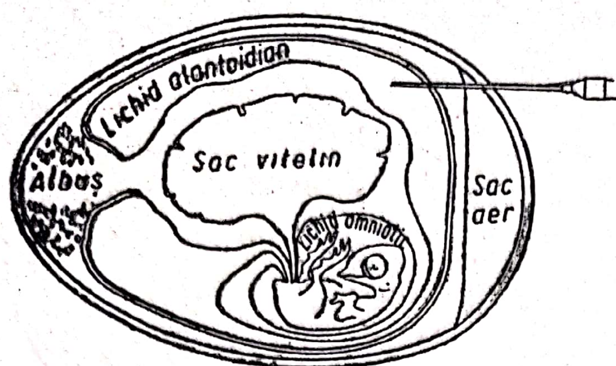


Fig. 96 — **Inocularea în cavitatea corioalantoidiană**

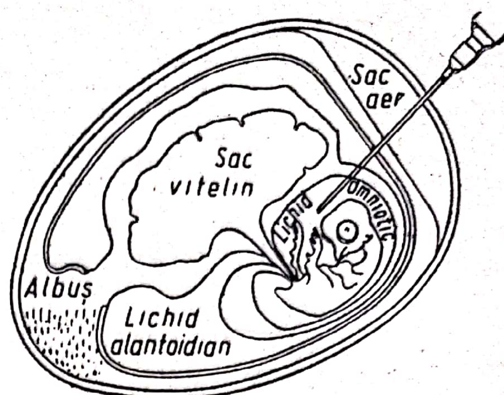


Fig. 97 — **Inocularea intraamniotică**

mirează zilnic. Pentru recoltarea lichidului alantoidian, ouăle se refrigerează la +4°C, se deschid apoi cu instrumente sterile în dreptul sacului aerian, se perforează membrana corioalantoidiană şi se aspiră cu pipeta sau cu o seringă lichidul.

3 — *Calea amniotică* este o cale foarte sensibilă pretîndu-se la izolări de virusuri din materiale patologice primare. Virusul introdus în cavitatea amniotică este ingerat de embrion şi va fi multiplicat în ţesuturile acestuia. Se pretează foarte bine pentru cultivarea virusurilor influenţei şi laringotraheitei păsărilor. Se folosesc, în general, embrioni de 10—12 zile, dar se pot folosi şi embrioni mai tineri, pentru virusuri care se multiplică mai încet. Acul se introduce în direcţia embrionului (poziţia lui fiind marcată în prealabil prin ovoscopie) prin sacul de aer, pe o distanţă de cca 30 mm. Străpungerea membranei amniotice este indicată de mişcarea embrionului simţită prin ac. Inoculul este de 0,1—0,2 ml şi se depune în cavitatea amniotică. Recoltarea interesează în special embrionul şi lichidul amniotic şi se face după îndepărtarea lichidului alantoidian, după tehnica descrisă anterior.

4 — *Calea intravitelină* se foloseşte mai mult pentru izolarea şi cultivarea rickettsiilor, a virusurilor grupei *Herpes simplex*, a virusului limbii albastre a oilor etc. Se folosesc embrioni în vîrstă de 5—6 zile, la care sacul vitelin este mai voluminos, iar celelalte învelitori embrionare nu sînt încă prea dezvoltate. Acul va trece prin camera de aer, paralel cu axul longitudinal al oului, pe o distanţă de cca 25—30 mm. După incubaţia necesară multiplicării agentului respectiv, se procedează la recoltarea sacului vitelin.

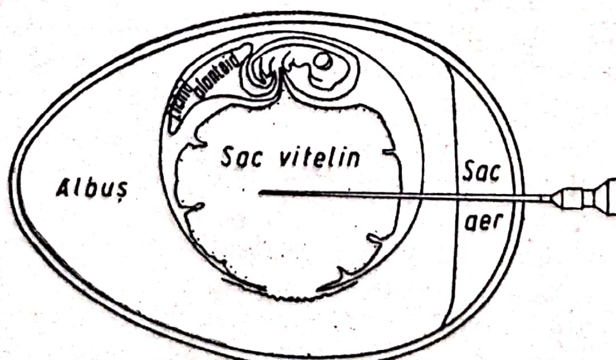


Fig. 98 — **Inocularea intravitelină**

Unele virusuri se cultivă bine indiferent de calea de inoculare folosită. Astfel virusul pestei aviare clasice, al encefalomielitelor ecvine, virusul Aujeszky, virusul Newcastle, se pretează la inocularea pe oricare din căile enumerate.

Unii agenţi virali şi rickettsieni pot fi cultivaţi pe membrana vitelină sau corioalantoidiană şi după o prealabilă îndepărtare a embrionului. Adăugarea unor lichide nutritive corespunzătoare ar permite celulelor acestor membrane să-şi continue procesele metabolice, virusul crescînd cantitativ.

Deschiderea ouălor embrionate inoculate se face după scurgerea unei perioade de timp de la inoculare, cînd, sub acţiunea patogenă a virusului, se produce moartea embrionului sau cînd se apreciază că în lichidele şi învelitorile embrionare cantitatea de material viral a atins o anumită concentraţie optimă, putînd fi recoltat. În acest din urmă caz, pentru omorîrea embrionilor, ouăle se pun la frigider la +4°C înainte de a fi deschise. Pentru deschiderea propriu-zisă, se procedează astfel:

— ouăle se transportă în boxa sterilă, se aşază pe stative speciale cu dopul de parafină (locul de inoculare) în sus;

— se badijonează întîi cu alcool şi apoi de două ori cu tinctură de iod;

— se taie coaja în jurul bazei camerei de aer, cu o foarfecă sterilizată prin fierbere şi flambată scurt ex tempore;



Fig. 99 — Deschiderea ouălor embrionate de găină

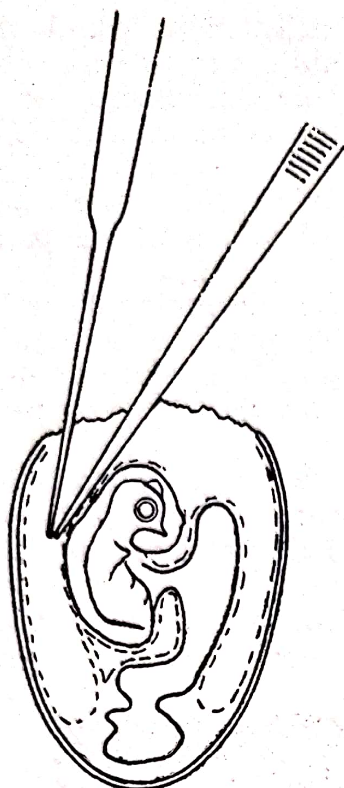


Fig. 100 — Recoltarea lichidului alantoidian

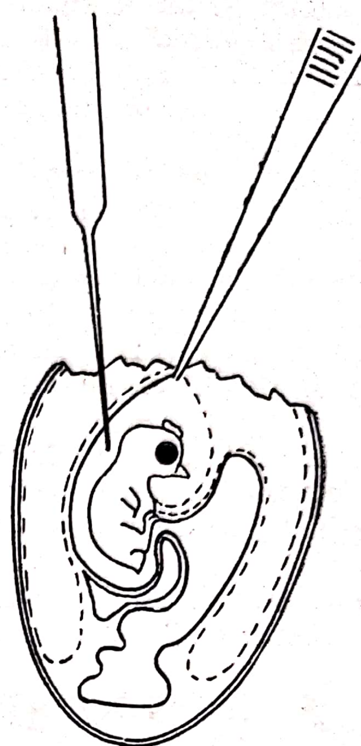


Fig. 101 — Recoltarea lichidului amniotic

— se sparge membrana cochilieră cu instrumente sterilizate în condiții de strictă asepsie, se recoltează apoi partea care interesează; se recomandă ca foarfecele și pensa care se folosesc pentru deschidere, să fie schimbate după fiecare ou.

a) Recoltarea lichidului alantoidian:

— se ridică membrana cochilieră, punîndu-se în evidență în acest fel membrana corioalantoidiană; se incizează cu o foarfecă sterilă;

— cu o pipetă cu bulă se aspiră lichidul alantoidian, apăsînd concomitent cu pensa embrionul, pentru a evita astuparea pipetei cu membrana corioalatoidiană.

Lichidul recoltat, în cantitate de 6—8 ml, este de culoare gălbuie și se pune în eprubete sterile, însămînțîndu-se totodată o cantitate de 0,1—0,2 ml pe medii obișnuite de cultură pentru control bacteriologic. Cînd se recoltează în serie, de la un număr mare de ouă, deci cantități mari de lichid, pipetarea fiind greoaie este indicat să se recurgă la recoltarea cu ajutorul unei pipete, racordate prin tub de cauciuc la un flacon, conectat la rîndul lui la o trompă sau pompă de vid (balon Erlenmayer cu dop de cauciuc străpuns de două tuburi din care unul duce la pipetă celălalt la trompă).

b) Recoltarea lichidului amniotic: după recoltarea lichidului alantoidian se prinde sacul amniotic cu o pensă fină și se puncționează cu o pipetă, aspirîndu-se lichidul din sac. Se pot recolta în acest fel 2—3 ml lichid amniotic care apare limpede și incolor.

c) Recoltarea embrionului și sacului vitelin: după secționarea membranei corioalantoidiene, embrionul se prinde cu o pensă și se scoate din ou secționîndu-se pediculul omfalic.

Pentru recoltarea sacului vitelin se varsă conținutul oului într-o placă Petri sterilă, după care, prin secționare, se lasă să se scurgă conținutul sacului vitelin și acesta se trece într-o altă placă sterilă și se spală cu soluție fiziologică sterilă.

d) Recoltarea membranei corioalantoidiene: oul se așază vertical sau orizontal, în funcție de calea de inoculare, se secționează coaja în dreptul camerei de aer și se scoate conținutul oului (embrionul, sacul vitelin etc.) reținînd membrana corioalantoidiană cu pensa. Aceasta se detașează de membrana cochilieră și se pune într-o placă Petri. Pentru examinarea membranei se poate pune în placa respectivă soluție fiziologică sau amestec de soluție fiziologică și ser de cal.

După ce au fost recoltate lichidele și țesuturile care interesează, resturile de ou se pun în găleți închise și se transportă la autoclav pentru sterilizare. Capacele de ou, cojite, ce rezultă din manipulările legate de această operațiune, se pun în borcane cu sublimat, existente în boxa sterilă unde se lucrează.

Toate aceste lucrări este recomandabil să se efectueze de către personal calificat și protejat corespunzător, mai ales cînd este vorba de virusuri patogene (ochelari de protecție, măști faciale etc.).

Pasajele de virus pe embrioni de găină se fac cu scopul de a asigura păstrarea și verificarea în timp a patogenității virusurilor pentru embrioni de găină.

În acest scop, materialele virulente (lichide, învelitori) păstrate la congelator, se decongelează. Dacă se consideră necesar, se adaugă antibiotice (streptomicină) și se omogenizează totul cu ajutorul perlelor

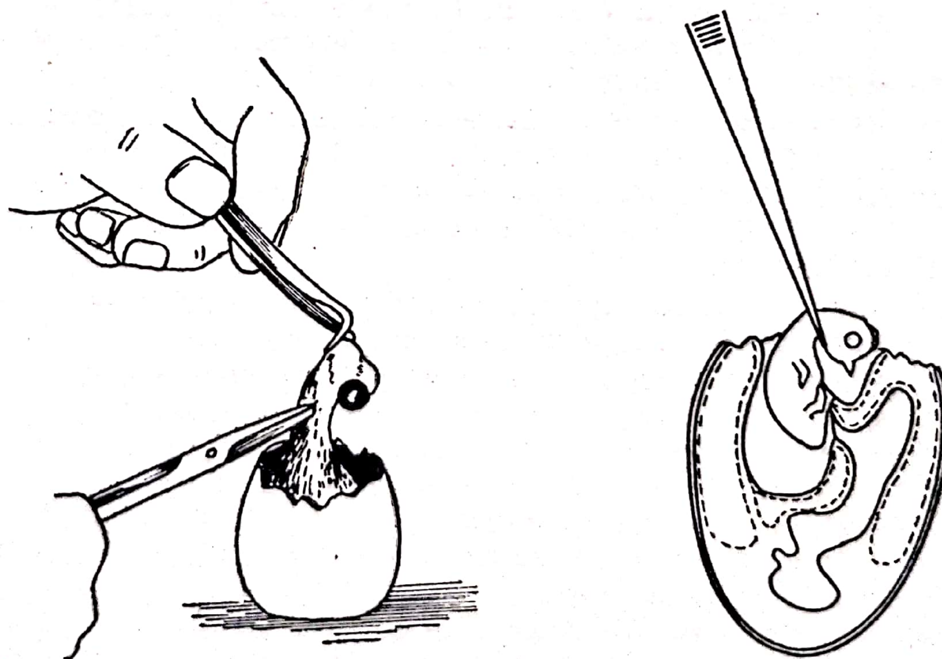


Fig. 102 — Recoltarea embrionului de găină

de sticlă, după care se centrifughează și, din supernatant, se inoculează la alte ouă embrionate, procedîndu-se întocmai ca la inocularea primară.

Inocularea animalelor de experiență în vederea izolării, întreținerii sau tipizării unor virusuri

Folosirea animalelor de experiență, în scopul de a izola, întreține sau tipiza un virus, este cu atît mai necesară cu cît unele virusuri nu pot fi cultivate prin alte procedee, sau dacă aceasta reușește, indicațiile nu sînt suficiente pentru a preciza însușirile lor biologice. Alegerea gazdei animale în acest scop este dependentă de spectrul de patogenitate al virusului în cauză, cunoscîndu-se electivitatea pe care diferite virusuri o au pentru diferite specii sau pentru diferite țesuturi. Este necesar însă ca aceste animale să fie libere de virusul respectiv, fapt decelabil, între anumite limite, prin reacții serologice.

Pentru o corectă interpretare a capacității patogene a virusului studiat, este necesar ca animalele inoculate să fie cît mai riguros izolate, mai ales cînd este vorba de virusuri transmisibile prin contact.

O modalitate deosebită, care oferă certitudinea inoculării unor animale indemne, este reprezentată de folosirea așa-numitelor „animale libere de germeni" (germfree sau gnotobiotice). Pentru obținerea acestora se recurge la extragerea prin histerotomie, în condiții perfecte de asepsie, a fetușilor aflați în ultima fază a dezvoltării lor intrauterine și creșterea lor în continuare la adăpost de germeni.

Vîrsta la care se face inocularea este diferită în funcție de virusul cercetat și de receptivitatea speciei respective. În principiu, cu cît ea este mai fragedă, sensibilitatea animalului este mai mare. Animalele în primele 24 de ore de viață sînt deosebit de receptive față de anumite virusuri. La această vîrstă ele sînt, în unele cazuri, receptive față de virusuri care mai tîrziu nu sînt capabile să determine nici un fel de tulburări sau le pot provoca numai în anumite condiții.

Astfel, de exemplu, șoarecii sînt sensibili față de virusul encefalomielitelor ecvine, al febrei aftoase, față de virusul Coxsackie, față de virusul vaccinal, față de rinovirusuri, față de virusul parainfluenței etc. Șobolanii, iepurii și cîinii sînt sensibili față de virusul febrei aftoase numai la o vîrstă foarte fragedă.

Uneori infecția experimentală reușește numai prin folosirea unei anumite căi de inoculare. Așa de exemplu, infecția cu virusul mixomatozei la șoarecii sugari reușește numai prin inocularea intracerebrală. Inocularea și mai ales pasajele succesive pe o anumită cale, cu care un anumit virus nu este „obișnuit", se soldează cu o serie de modificări ale însușirilor biologice ale virusului respectiv, mai ales sub raportul patogenității. Astfel, de exemplu, inocularea succesivă a virusului pestei porcine pe cale intracerebrală la iepure, a dus la obținerea unor tulpini lapinizate cu o patogenitate redusă, dar care și-au conservat proprietățile imunogene. De asemenea, inocularea în serie a virusului rabic pe cale intracerebrală la iepure a dus la obținerea „virusului rabic fix" cu însușiri particulare față de virusul „de stradă".

În acelaşi context se poate aminti aci şi procedeul de trecere a unor virusuri specifice mamiferelor pe ouă embrionate, obţinîndu-se „tulpini avianizate" cu patogenitate modificată şi cu valoare imunogenă conservată.

Alteori, cultivarea unui virus pe o anumită specie de animale de experienţă reuşeşte numai după o „adaptare" de durată variabilă (pasaje). Astfel, virusul pseudopestei aviare poate fi cultivat pe şoareci, hamsteri, iepuri, şobolani sau boboci de raţă, numai după cîteva asemenea pasaje.

Unele virusuri inoculate la animalele de experienţă nu se multiplică în organismul acestora, dar se conservă în diferite ţesuturi. Astfel este cazul virusului jigodios inoculat la iepure şi şobolan. Altele determină infecţii latente, care nu se manifestă clinic, deşi virusul se multiplică şi generează anticorpi specifici, decelabili prin reacţii serologice (de exemplu adenovirusurile inoculate la cobai şi iepuri).

În fine, trebuie menţionat că unele animale de experienţă sînt receptive faţă de infecţia cu unele virusuri numai pe cale experimentală, în condiţii naturale fiind total refractare. Astfel, poate fi menţionat iepurele, care face boala lui Aujeszky numai în condiţii experimentale sau cobaiul care face febra aftoasă numai prin inocularea virusului aftos în dermul plantar.

Este necesar ca animalele de experienţă să se găsească într-o stare fiziologică optimă (să nu fie subnutrite, carenţate, parazitate sau bolnave de alte boli, chiar latente). În caz contrar, rezultatele inoculărilor vor fi eronate sau compromise.

Dintre animalele care pot fi folosite pentru inoculările experimentale în cazul virusurilor cele mai importante sînt:

— iepurele (virusul bolii lui Aujeszky, al mixomatozei, virusul vaccinal, virusul stomatitei veziculare);

— cobaiul (virusul febrei aftoase, virusul vaccinal, virusul stomatitei veziculare);

— hamsterul auriu (virusul stomatitei veziculare, virusul exantemului veziculos al porcului, virusul pneumoniei virotice a hamsterilor);

— şoarecele (virusul parainfluenţei, virusul influenţei porcine, virusul pneumoniei şoarecilor, virusul turbării, virusul carcinomului mamar murin);

— şobolanul (virusul stomatitei veziculare, virusul influenţei porcine);

— cîinele (virusul pestei ecvine, virusul jigodiei, virusul hepatitei infecţioase Rubarth);

— pisica (virusul leucopeniei infecţioase);

— puii de găină (virusul variolei aviare, virusul bronşitei infecţioase, virusul laringotraheitei aviare);

— bobocii de raţă (virusul hepatitei bobocilor de raţă);

— purceii (virusul pestei porcine clasice, virusul pestei porcine africane, virusul vaccinal, virusul variolei porcine);

— porumbelul (virusul variolei aviare);

— maimuţa (reovirusuri, virusuri polio).

Căile de inoculare sînt variabile, în funcţie de virusul în cauză şi de specia animalului de experienţă folosit. Ele sînt identice cu cele folosite în bacteriologie: digestivă, respiratorie, conjunctivală, cutanată, intrader-

mică, subcutanată, intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă, intracerebrală, intraoculară etc. Dozele inoculate variază de asemenea cu virusul, tulpina, calea de inoculare, specia, talia și vîrsta animalelor folosite.

Teste de sensibilitate a virusurilor

Trebuie precizat însă că în afară de metodele amintite, pentru caracterizarea însușirilor biologice ale virusurilor, se practică frecvent și alte examene, între care testele de sensibilitate față de unii agenți chimici joacă un rol de seamă.

Testul de sensibilitate față de eter. Se pun în contact 1,6 ml virus de cultură, cu 0,4 ml eter în concentrație 20% și se lasă în contact 24 de ore. După acest interval, se evaporă eterul și din materialul obținut se inoculează 4—6 tuburi cu culturi celulare. Apariția efectului citopatic în monostratul celular indică rezistența virusului la eter ceea ce reprezintă un criteriu important de diferențiere în cazul virusurilor citopatogene.

Testul de sensibilitate față de cloroform. Se execută după același procedeu ca și precedentul, numai că după 24 de ore îndepărtarea cloroformului se face prin centrifugare, timp de 30 minute la 3000 t/minut. Cloroformul, fiind mai greu, se depune la fundul cupei de centrifugă. Supernatantul se inoculează în tuburi de culturi celulare și se interpretează rezultatul prin examinare, zilnică, în vederea observării apariției efectului citopatic.

Testul de sensibilitate la pH diferit constă în menținerea suspensiei virale la pH-ul dorit, timp de 3 —4 ore, la temperatura camerei și întuneric. Pentru realizarea pH-ului urmărit (acid sau alcalin) se fac amestecuri în proporții diferite din două soluții:

A — soluție 0,2 molar Na_2HPO_4
B — soluție 0,1 molar $C_6O_3H_7$

Pentru obținerea pH-ului 3, de exemplu, se amestecă 2,02 ml soluție A + 7,98 ml soluție B.

La 10 ml soluție cu pH-ul dorit se adaugă 0,5 ml virus de cultură. După 3—4 ore de menținere la temperatura camerei, se neutralizează cu o soluție de NaOH 0,1 molar în prezența indicatorului roșu fenol și se inoculează 4—6 tuburi de culturi celulare. Dacă în tuburile inoculate, apare efectul citopatic, rezultă că virusul este rezistent la pH-ul respectiv. Toate aceste probe se pot practica în această manieră numai în cazul virusurilor citopatogene.

Reacțiile serologice în identificarea virusurilor și diagnosticul infecțiilor virale

Pentru diagnosticul infecțiilor de natură virală servesc o serie de metode serologice, dintre care le redăm pe cele mai importante.

1 — **Reacția de hemaglutinare** a fost folosită pentru prima dată de Hirst, în 1941, în identificarea virusului gripal (de unde și numele de reacția Hirst). Nu este propriu-zis o reacție serologică, deoarece nu se bazează pe cuplarea antigenului cu anticorpul, ci pe însușirea pe care o au unele virusuri (virusul Newcastle, virusurile influenței A, B, C, virusurile parainfluenței tipurile 1, 2, 3, unele adenovirusuri, arbovirusuri, pox-virusuri), de a determina aglutinarea globulelor roșii, aparținînd

diferitelor specii de mamifere şi păsări. Mecanismul hemaglutinării variază cu specia de virus în cauză. Hemaglutininele unor virusuri sînt asociate particulei virale, deoarece pot fi separate prin centrifugare sau absorbţie (pox-virusuri). În cazul altora (mixovirusuri) virusul conţine enzima numită neuraminidaza, care disociază acidul sialic din mucoproteinele receptorilor celulari ai globulelor roşii, ceea ce face ca aceste globule, chiar după eluţia virusului, să nu mai fie aglutinabile. Virusul inactivat prin formol sau căldură îşi menţine capacitatea hemaglutinantă. Între virusurile izolate de la animale, virusul Newcastle are cel mai pregnant reprezentată această proprietate. Ea a fost semnalată de Burnet în 1942, care a arătat că virusul pseudopestei aviare determină aglutinarea reversibilă a eritrocitelor de pasăre, adică după ce a fost adsorbit pe suprafaţa acestora şi a determinat aglutinarea, el poate fi separat din nou (fenomen numit eluţie), fără a-şi pierde capacitatea hemaglutinantă faţă de alte globule proaspete. Eritrocitele odată aglutinate nu mai sînt aglutinabile, întrucît receptorii celulari, pe care virusul se fixează, au fost distruşi printr-un fenomen enzimatic.

Capacitatea virusului de a produce hemaglutinarea nu este anihilată de acţiunea căldurii şi a formolului. Eluţia virusului însă poate fi alterată prin acţiunea periodatului de potasiu.

Aplicarea fenomenului de hemaglutinare comportă:

a) prepararea unei suspensii convenabile de globule roşii;

b) obţinerea unei suspensii virale hemaglutinante specifice (cu hemaglutinine).

a) *Prepararea suspensiei de eritrocite de pasăre.* Recoltarea sîngelui se face prin puncţia venei axilare sau prin puncţia cardiacă. Este preferabilă folosirea sîngelui de amestec de la 2—3 păsări. Recoltarea se face pe citrat 3,8‰ în proporţie de 1/5 şi este urmată de centrifugare 10 minute la 1000—1500 t/minut. Plasma se decantează şi se înlocuieşte cu o soluţie fiziologică sterilă de spălare, se centrifughează din nou şi după 2—3 spălări, se face o suspensie de 0,5‰ eritrocite în apă fiziologică sau soluţie tamponată (la pH 7,1—7,2). Dacă eritrocitele nu sînt folosite imediat, se pot păstra la +4°C, 4—5 zile, în lichid Alsever (20,5 g glucoză, 8 g citrat de sodiu, 4,2 g NaCl, ad 1 000 ml apă bidistilată, pH-ul fiind de 6,1). Suspensia de eritrocite se prepară întotdeauna ex tempore şi trebuie să aibă un aspect mat, moarat.

b) *Suspensia virală* poate fi obţinută din lichidele periembrionare ale ouălor de găină, inoculate cu virusul cunoscut, sau cu materialul suspect din culturile celulare inoculate în prealabil cu virusul respectiv. Pentru a obţine o cantitate mai mare de corpusculi virali pe unitatea de volum, se poate recurge la concentrarea prin centrifugare timp de 30—60 minute la 12 000—20 000 t/minut sau prin adsorbţia virusului pe hematii (40 minute la 0°) şi eluarea imediată într-o cantitate de diluant inferioară celei iniţiale, de exemplu 10/1 (prin încălzire timp de două ore la baie de 37°C).

Ca material virulent se pot folosi şi suspensii de organe (pulmon, ficat, creier etc.), de preferinţă cele cunoscute ca fiind cele mai bogate în virus (în funcţie de boală). Organele se mojarează şi se suspendă în soluţie fiziologică în proporţie de 1/10. După o centrifugare de 15 minute la 3 000 t/minut, supernatantul care conţine virusul poate fi folosit pentru reacţia de hemaglutinare.

Reacţia se poate practica pe lamă, în tuburi sau în plăci cu godeuri.

Reacţia de hemaglutinare pe lamă. Pe o lamă de microscop sau, preferabil, pe o placă de porţelan, se pun două picături din materialul virulent. Se adaugă aceeaşi cantitate din suspensia de globule roşii 1%. Se amestecă cu o baghetă sau prin înclinări repetate. În caz pozitiv, se produce aglutinarea globulelor roşii în cîteva minute, sub formă de aglomerări mai mari sau mai mici, iniţial spre periferia picăturii, apoi în toată masa amestecului.

Reacţia de hemaglutinare în tuburi. În serii de cîte 10 tuburi de reacţie pentru fiecare probă, se repartizează soluţie fiziologică astfel: în primul tub se pun 0,9 ml, iar în celelalte cîte 0,5 ml. Se adaugă primului tub 0,1 ml material virulent şi se omogenizează, obţinîndu-se în acest fel diluţia de 1/10. Din aceasta se trec 0,5 ml în tubul al doilea şi se omogenizează, obţinîndu-se diluţia 1/20. Se procedează în mod similar pînă la ultimul tub, realizîndu-se în continuare diluţii crescînde de 1/40, 1/80 ş.a.m.d. (din ultimul tub 0,5 ml se aruncă). În tubul martor se pune doar 0,5 ml soluţie fiziologică, fără material virulent. În toate tuburile, inclusiv martorul, se adaugă cîte 0,5 ml suspensie de globule roşii 0,5%. Se agită şi se lasă în repaus. Citirea se face după 30 de minute şi 60 de minute, examinîndu-se fundul eprubetelor cu ajutorul unei oglinzi. Notarea intensităţii hemaglutinării se face astfel:

++++ globulele roşi aglutinate acoperă tot fundul tubului, sub forma unui strat uniform, granular, cu margini neregulate;

+++ globulele roşii aglutinate acoperă o parte din fundul tubului, depozitul este granular cu marginile franjurate;

++ depozitul de globule roşii are aspectul de disc, cu periferia granulară formată din elemente aglutinate;

+ depozitul de globule roşii este de forma unui disc aproape de dimensiunile celui din tubul martor, dar periferia este uşor granulată;

— globulele roşii formează un depozit lenticular, sub forma unui disc roşu de 3—4 mm diametru, cu marginile regulate, în timp ce lichidul supernatant este perfect limpede; prin agitare se omogenizează perfect.

Titrul hemaglutinant al materialului virulent este dat de ultima diluţie în care are loc o aglutinare net pozitivă, notabilă cu ++.

În acest fel deci, hemaglutinina (suspensia virală hemaglutinantă) este titrată, stabilindu-se şi diluţia minimă de virus capabilă să provoace o aglutinare totală.

Reacţia de hemaglutinare în plăci cu godeuri este din ce în ce mai larg folosită în laboratoarele de specialitate. Plăcile cu godeuri sînt confecţionate din material plastic, folosindu-se, de obicei, o singură dată. Pentru obţinerea diluţiilor succesive se folosesc dispozitive speciale, manevrate manual sau mecanizat, care realizează şi o omogenizare corespunzătoare. Prin asemenea dispozitive se obţine un plus de precizie, multă economie de timp, expeditivitate şi economie de reactivi.

Trebuie însă precizat că reacţia de hemaglutinare nu este strict specifică, în sensul că ea este proprie mai multor virusuri şi chiar unor germeni (micoplasmele). De aceea, în completarea ei, este neapărat necesar să se folosească reacţia de inhibare a hemaglutinării.

2 — **Reacția de inhibare a hemaglutinării.** Se bazează pe faptul că anticorpii conținuți de un ser imun, provenind de la subiecte trecute prin boală sau imunizate, sînt capabili să neutralizeze capacitatea hemaglutinantă a virusurilor. În general, aceștia ating în organism nivelul decelabil după 7—10 zile de la infecție.

Principiul reacției constă în punerea în contact a serului conținînd anticorpii specifici cu suspensia virală și după o incubație de 1/2 oră la 37°C amestecul se pune în contact cu suspensia de globule roșii 0,5%. Reacția se poate folosi în două alternative:

— procedeul alfa — în care suspensia de virus este diluată în serie și amestecată cu cantități egale de ser test cunoscut;

— procedeul beta — în care serul diluat în serie este amestecat cu cantități constante de virus diluat la un număr cunoscut de unități hemaglutinante;

În ambele cazuri, dacă se produce cuplul anticorp-virus hemaglutinant, fenomenul de aglutinare a eritrocitelor nu mai are loc.

Tehnica de lucru. Într-o serie de tuburi de reacție, se fac diluții succesive de ser: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 ș.a.m.d. În acest scop se pun în primul tub 0,45 ml soluție fiziologică iar în celelalte 0,25 ml. Se adaugă apoi în primul tub 0,05 ml ser și se omogenizează prin pipetare, după care se trec în tubul al doilea 0,25 ml. Se omogenizează și se trec în al 3-lea 0,25 ml. Apoi se adaugă fiecărui tub 0,25 ml suspensie de antigen titrat în prealabil prin hemaglutinare, și diluat astfel încît volumul de 0,25 ml să conțină 4 doze minime hemaglutinante. De exemplu, dacă virusul a aglutinat globulele roșii pînă la diluția de 1/160, în reacția de inhibare se va folosi antigenul diluat la un titru de 1/40. Se agită tuburile pentru omogenizare și se lasă la temperatura camerei timp de 15—20 minute. Se adaugă apoi cîte 0,5 ml suspensie de globule roșii 0,5% în fiecare tub. Se agită, se lasă la temperatura camerei 1,1/2—2 ore, după care se face citirea, după aceleași criterii ca la hemaglutinare, numai că imaginile sînt inverse, în sensul că în primele tuburi unde există o cantitate mai mare de anticorpi, hemaglutinarea nu se produce iar globulele roșii se depozitează sub forma unui disc. În tubul martor, ca și în cele cu reacție negativă, din cauza abundenței anticorpilor, virusul se adsoarbe pe eritrocite și are loc hemaglutinarea.

Această reacție permite deci să se stabilească natura anticorpilor dintr-un ser sau specia de virus izolată (prin cultivare) sau existentă în organele de la animale bolnave.

Ca și hemaglutinarea, RIHA se poate efectua și în plăci cu godeuri, tehnica beneficiind de aceleași avantaje. Cantitatea care se folosește în acest caz este de 0,025 ml din fiecare element.

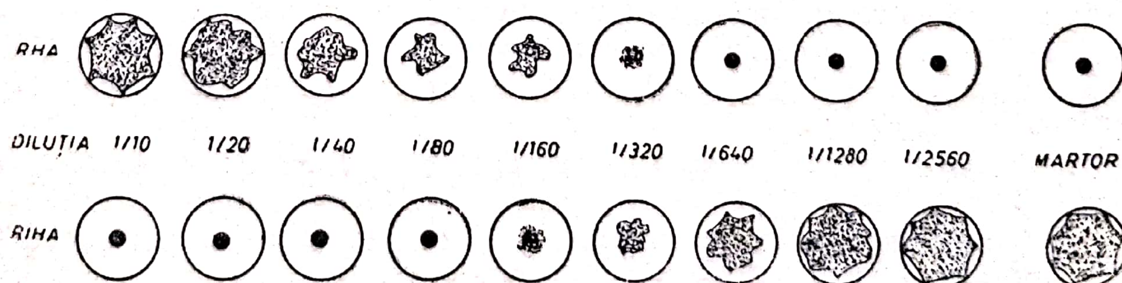


Fig. 103 — **Aspectul schematic al fundului eprubetelor în reacțiile de hemaglutinare și inhibare a hemaglutinării**

3 — **Reacţia de hemaglutinare indirectă sau pasivă** este o variantă a reacţiei de hemaglutinare şi constă în aglutinarea de către serul imun a antigenului viral adsorbit în prealabil pe hematii tanate şi formolate.

4 — **Reacţia de hemadsorbţie** este utilă în special în cazul acelor virusuri care nu au însuşiri citopatogene pregnante sau le lipsesc total, dar dispun de capacitate hemadsorbantă. Pentru a pune în evidenţă această însuşire, se foloseşte direct cultura celulară în care s-a dezvoltat virusul. În acest caz, adăugarea unei suspensii de globule roşii spălate, se soldează cu fixarea acestora pe celulele în care există virusul, în timp ce, virusul lipseşte, globulele roşii plutesc libere deasupra stratului celular şi se pot îndepărta prin spălare uşoară. Fenomenul de hemadsorbţie se observă mai bine prin examenul microscopic al monostratului celular.

5 — **Reacţia de inhibare a hemadsorbţiei.** Dacă înainte de adăugarea suspensiei de globule roşii, cultura celulară conţinînd virusul hemadsorbant se tratează cu un ser imun corespunzător, hemadsorbţia nu mai are loc.

6 — **Testul hemolizei** se bazează pe capacitatea unor virusuri de a determina liza globulelor roşii. A fost descris de BURNET în 1950, dar nu este prea folosit.

7 — **Testul anticorpilor fluorescenţi** permite depistarea foarte precoce a virusurilor. Se bazează pe faptul că anticorpii specifici pot fi cuplaţi cu substanţe fluorescente (cel mai frecvent folosit este izotiocianatul de fluoresceină) şi prin unirea cu particulele virale corespunzătoare, acestea devin vizibile la examinarea în lumină ultravioletă. Se poate folosi o metodă directă şi una indirectă.

În cazul metodei directe, substratul celular cultivat pe lamele, în tuburi Barski şi conţinînd antigenul (particule virale) este tratat cu serul specific cuplat cu substanţa fluorescentă. După o perioadă de contact variabilă, se procedează la spălarea substratului celular. Dacă el conţine virusul căutat, cuplul antigen-anticorp-substanţă fluorescentă nu este îndepărtat prin spălare şi la examinare în RUV apar particule fluorescente.

În cazul metodei indirecte, cu ajutorul unui substrat celular infectat cu un virus cunoscut, se caută prin punerea în contact cu seruri de la indivizi suspecţi, prezenţa anticorpilor specifici. În folosirea unor diluţii variabile se poate determina titrul exact al anticorpilor.

8 — **Testul de seroneutralizare.** Încă din 1889 VICTOR BABEŞ a arătat că sîngele animalelor imunizate antirabic are *in vitro* capacitatea de a face neinfectantă o suspensie de virus rabic. Anticorpii formaţi în mod activ de către un organism care a venit în contact cu un agent viral, sînt capabili să neutralizeze valoarea infectantă a virusului corespunzător. Pe această bază a fost concepută reacţia de seroneutralizare. Ea presupune două etape principale:

a) contactul dintre virus şi serul specific (proces ce se desfăşoară *in vitro*).

b) inocularea amestecului virus-ser la o „gazdă“ sensibilă, capabilă să indice dacă virusul a rămas sau nu activ în amestec.

Ca „gazde“ se pot folosi animale de laborator, ouă embrionate sau culturi celulare. Folosirea culturilor celulare pentru reacţii de seroneu-

tralizare prezintă o serie de avantaje față de ouăle embrionate sau animalele de experiență și anume:

— culturile celulare sînt lipsite de sisteme de apărare ale organismului și prin aceasta sînt mai sensibile;

— culturile celulare reprezintă o unitate biologică mult mai omogenă decît animalele sau ouăle embrionate, atît ca tip de celule cît și ca susceptibilitate; animalele de laborator și în bună măsură și ouăle dovedesc mari variații individuale, cu posibilități fiziologice diferite;

— rezultatele se pot citi mult mai repede în cazul culturilor celulare;

— culturile oferă posibilități de efectuare a reacției, folosind virusuri față de care nu există animale de laborator sensibile (unele adenovirusuri, virusurile ECHO);

— culturile celulare sînt mai puțin costisitoare și mai ușor de manevrat.

Seroneutralizarea se poate folosi în mai multe scopuri:

a. identificarea unui virus izolat, necunoscut, folosind seruri imune cunoscute;

b. identificarea unor seruri necunoscute, utilizînd virusuri cunoscute ca de exemplu în determinarea prezenței în sîngele unor animale a anticorpilor față de un anumit virus.

Elementele reacției de seroneutralizare:

— *culturile* care trebuie să fie omogene, preparate din țesuturi sau celule cunoscute ca fiind sensibile față de virusul cu care se va lucra, iar mediul nutritiv trebuie să asigure o viabilitate corespunzătoare;

— *virusul* care reprezintă o suspensie obținută din cultura virusului respectiv în culturi de celule, cu un titru cunoscut, determinat în prealabil, care va condiționa și diluția în care se va folosi;

— *serul* care este obținut prin hiperimunizarea diferitelor animale de laborator cu virusuri cunoscute, conform unei scheme de imunizare corespunzătoare. Conservarea serurilor se face sub formă congelată la —20°C sau liofilizată. Se vor folosi diluții crescînde de ser în SST, soluție Hanks sau Earle (nu în apă fiziologică obișnuită).

Tehnica reacției constă în punerea mai întîi în contact *in vitro* a diluțiilor de ser imun cu suspensia virală avînd un titru de 100 DLP_{50} (în volume egale). După o incubație de 1—2 ore la 37°C la termostat, amestecul se inoculează pe culturi celulare și se urmărește apariția efectului citopatic, prin examinare periodică la microscop. Din fiecare diluție se inoculează 4—5 tuburi cu cultură, avîndu-se în același timp grija de a avea și tuburi de control după cum urmează:

— 4—5 tuburi inoculate numai cu virus;
— 4—5 tuburi inoculate numai cu ser;
— 4—5 tuburi neinoculate.

Examinarea culturilor începe cu tuburile în care s-a inoculat numai virus, apoi cele inoculate cu amestec ser-virus și, în fine, cele neinoculate. Acestea din urmă trebuie să rămînă de aspect normal, ca și cele în care s-a inoculat amestec virus-ser în proporții corespunzătoare.

Reacția de seroneutralizare se poate efectua fie cu scopul de a pune în evidență existența în serurile indivizilor bolnavi sau suspecți a anticorpilor specifici, caz în care se lucrează cu suspensii de virus cunoscute,

fie cu scopul de a identifica un virus, caz în care se lucrează cu seruri imune cunoscute.

Există şi teste cantitative care urmăresc stabilirea puterii de neutralizare a unui ser, exprimată în unităţi neutralizante pe ml. În acest scop, se pot folosi metode diferite (metoda virus-ser variabil, sau metoda ser constant-virus variabil).

Reacţia de seroneutralizare se poate aprecia şi prin metoda reducerii plajelor care oferă posibilitatea unor neutralizări foarte precise. În acest scop, se pot folosi culturi în monostrat celular acoperit cu un strat de agar sau celule libere înglobate în agar, după tehnicile descrise de DULBECCO şi VOGT. Metoda constă în amestecarea unor diluţii diferite de ser cu cantităţi constante dintr-o suspensie virulentă diluată, astfel încît să producă un anumit număr de plaje. Pentru interpretare se compară numărul plajelor formate în plăci cu ser şi în plăci fără ser.

În cazul folosirii ouălor embrionate, după contactul virusului cu serul imun se procedează la inocularea pe cale intraalantoidiană sau intravitelină, urmărindu-se apoi, prin ovoscopie, moartea embrionilor sau, prin sacrificare la anumite intervale, instalarea unor leziuni specifice. Cînd virusul este neutralizat, acestea nu apar.

În cazul aplicării seroneutralizării pe animale, se aleg specia, calea şi doza de inoculare, cea mai corespunzătoare, urmărindu-se apoi apariţia semnelor clinice şi a leziunilor specifice.

Testul inhibiţiei metabolice este o reacţie de seroneautralizare care se foloseşte pentru identificarea unor enterovirusuri, adenovirusuri şi herpes-virusuri producătoare de efect citopatic precoce. În acest scop, se vor face diluţii seriate din seruri test cunoscute, la care se va adăuga o suspensie virală în diluţie cunoscută şi constantă. Amestecul se inoculează apoi în tuburi cu culturi celulare proaspete şi se urmăreşte virarea culorii mediului; un pH de 7,4 şi mai mare la sfîrşitul perioadei de incubaţie indică o activitate citopatogenică prezentă, deci dezvoltarea virusului, în timp ce un pH de 7,2 şi mai mic pune în evidenţă fenomenul de neutralizare a acestuia.

Testul de neutralizare pote fi folosit şi pentru identificarea unor toxine pe care unele virusuri şi rickettsii le pun în libertate în mediul în care se dezvoltă.

9 — **Testul fixării complementului** este unul din cele mai larg folosite, mai ales datorită rapidităţii obţinerii rezultatelor. În majoritatea virozelor, anticorpii fixatori apar mai tîrziu decît cei neutralizanţi sau aglutinanţi — în general după 10—12 zile — şi titrul lor scade mai rapid.

Tehnica, în principiu, este aceeaşi cu cea descrisă anterior. S-au aplicat însă diferite modificări menite să-i mărească gradul de specificitate. Astfel se poate aminti de exemplu fixarea complementului la +4°C în loc de +37°C. Datorită faptului că virusurile nu se pot cultiva decît pe celula vie, antigenii nu pot fi preparaţi decît din celule vii sau lichide infectante, ceea ce impune introducerea în reacţie a unui martor conţinînd ţesut normal neinoculat (similar cu cel pe care s-a cultivat virusul). În laboratoarele moderne se folosesc microteste practicate cu dispozitive de diluţie automată sau semiautomată care simplifică şi uşurează foarte mult întregul proces. În plus, se realizează economie de ingrediente ceea ce este important mai ales în ceea ce priveşte antigenul viral, care nu se poate obţine în cantităţi mari, cu atîta uşurinţă ca în bacteriologie.

În cazul acestor microtehnici, se folosesc volume mai mici de 0,02 ml lucrîndu-se cu micropipete sau prin picături (o picătură este de 0,02 ml) iar volumul total de reacţie fiind 0,1 ml. Se pot folosit în acelaşi scop şi anse speciale, calibrate la un volum fix, riguros determinat.

10 — **Testul de precipitare** se foloseşte după tehnica difuziunii în gel descrisă de OUCHTERLONY şi constă în folosirea unor antigene virale (suspensii de virus în lichidele nutritive ale culturilor celulare, în lichidele embrionare, suspensii de organe de la animale inoculate experimental), de obicei concentrate şi a unor seruri imune corespunzătoare. Acestea se amplasează în godeuri efectuate în agar special, la distanţe bine determinate. Antigenii virali difuzează de la nivelul godeurilor unde au fost amplasaţi concomitent cu anticorpii conţinuţi de serul imun. La locul de întîlnire a celor două componente rezultă linii de precipitare vizibile cu ochiul liber mai ales după o colorare corespunzătoare. Metoda a fost folosită cu succes în studii asupra virusurilor variolice, a adenovirusurilor şi a unor herpes-virusuri. La enterovirusuri metoda nu a dat rezultate. Este necesară însă folosirea unor antigene foarte concentrate, pentru ca interpretarea să poată fi fidelă.

Tehnica detaliată a reacţiei de imunodifuziune în gelul de agar, pentru diagnosticul anemiei infecţioase a calului, de exemplu, este descrisă la capitolul „Examenele serologice".

Se înţelege că dintre cele două elemente (antigenul sau anticorpul) unul trebuie să fie cunoscut. Deci reacţia se poate folosi fie pentru a identifica un virus necunoscut cu ajutorul unui ser imun cunoscut, fie pentru decelarea într-un ser suspect a prezenţei anticorpilor specifici, folosind un virus cunoscut.

O variantă a acestei metode este testul de precipitare radioizotopic în care se foloseşte virus radioactiv şi se măsoară gradul de radioactivitate al precipitatului rezultat din contactul cu anticorpii specifici.

11 — **Testul de floculare** se foloseşte pentru virusurile variolice, influenţei, virusul febrei aftoase; nu a luat o extindere largă. Anticorpii floculanţi apar mai devreme şi dispar mai precoce după infecţie.

Tehnici pentru cercetarea virusurilor bacteriofagice

Bacteriofagii sînt virusuri „patogene“ pentru bacterii, care pot determina în mod specific liza germenilor bacterieni printr-o tulburare survenită în fiziologia celulei datorită multiplicării lor în interiorul bacteriilor (și acumulării unor complexe chimice toxice). Descoperirea lor, legată de numele lui D'HERELLE (1917), pe lîngă că a lămurit o serie de fenomene curioase observate în cursul lucrărilor de laborator, a deschis perspective practice importante în procesul de tipizare a bacteriilor și chiar în terapeutica unor infecții bacteriene.

Fagul, ca parazit la nivel genetic, realizează în celula bacteriană sensibilă adaptarea tuturor funcțiilor acesteia, la sinteza componentelor structurale necesare asamblării fagice. „Infecția“ se termină prin ruperea membranei celulare (liza celulei) cu diseminarea particulelor fagice neoformate și începerea unui nou ciclu sau, în alte cazuri, prin simpla integrare a genomului fagic (profag) în genomul celulei gazdă. În această din urmă situație, fiecare multiplicare a genomului celular antrenează simultan o multiplicare a genomului fagic. Cu fiecare ciclu de multiplicare crește și numărul profagilor, iar la intervenția unor factori favorizanți (de temperatură, iradiere cu U.V. etc.), ei acționează ca inițiatori ai unui proces litic.

Sinteza diferitelor componente ale fagilor este secvențială și reglată în mod foarte riguros, finisarea realizîndu-se prin autoasamblare. În principiu, se recunosc trei secvențe ale procesului de morfogeneză fagică: sinteza acidului nucleic fagic, a capului și a cozii. Procesul este reglat de cca 20 de gene, unele codificînd sinteza proteinelor de structură, altele intervenind în reglarea acestor sinteze. O parte din ele dirijează sinteza acidului nucleic (de exemplu ADN) în timp ce altele se „ocupă“ de sinteza proteinelor constitutive ale capului și cozii și maturarea lor.

Fagii, ca și alte virusuri, fiind paraziți obligatorii ai unor microorganisme vii, nu se găsesc liberi în natură și însoțesc îndeaproape gazdele receptive. Produsele bogate în microorganisme sînt, ca urmare, sursele de bacteriofagi cele mai abundente.

În principiu, cercetarea fenomenelor de bacteriofagie trebuie să aibă în vedere următoarele:

— pentru multiplicarea fagilor trebuie să se folosească culturi bacteriene tinere, în faza de multiplicare logaritmică (culturi de 1—2 ore în mediu lichid obținute prin transplantare dintr-o cultură de 24 de ore pe mediu solid);

— mediile de cultură trebuie să fie convenabile sub raportul pH-ului şi conţinutului nutritiv, faţă de cerinţele specifice ale bacteriei indicatoare şi fagilor respectivi;

— să respecte particularităţile biologice şi de rezistenţă ale fagilor cercetaţi faţă de agenţii fizici şi chimici.

Izolarea unui fag se poate face plecînd fie de la un mediu natural, fie de la o bacterie lizogenă (capabilă de a suporta infecţia latentă cu fagul pe care îl transmit ereditar la descendenţi fără a fi lizate). În acest scop sînt necesare:

— tulpini bacteriene-test;

— medii de cultură convenabile pentru cultivarea tulpinilor test.

Ca tulpină-test poate servi orice suşe bacteriană, cu condiţia să nu fie lizogenă şi să fie sensibilă la fagi.

În mediul natural, produsele care oferă cele mai sigure surse de fagi sînt materiile fecale, solul şi apele de canal.

Din materiile fecale (metoda D'HERELLE, 1938): la 1 g fecale se adaugă 20 ml bulion. Amestecul se ţine la 37°C timp de o oră şi apoi, eventual după o centrifugare de 20—30 minute la o turaţie de 2000—3000 t/minut sau o trecere prin hîrtie de filtru, se filtrează prin Seitz sau un alt filtru care reţine bacteriile (G_5). Dat fiind faptul că, atît hîrtia de filtru cît şi filtrul Seitz sau filtrele de porţelan reţin o bună parte din fagi reducînd substanţial titrul lor, în ultimul timp se folosesc cu precădere filtrele din sticlă sinterizată sau membranele Gradocol. Se poate recurge şi la tratarea cu cloroform (0,5 ml cloroform la 10—20 ml) urmată de agitarea energică, după care se lasă să se limpezească cîteva ore la temperatura camerei sau peste noapte la frigider, după care se decantează. În cazul sistemelor fagobacteriene în care fagii sînt mai rezistenţi la temperatură decît bacteriile gazdă se poate face şi tratarea termică timp de 30—60 minute la 57—58°C. Filtratul, bacteriologic steril, este testat din punct de vedere al activităţii sale fagice, faţă de tulpini bacteriene cunoscute ca lizosensibile faţă de fagul căutat.

Din sol, tehnica de izolare este asemănătoare: 1 g de sol se suspendă în 20 ml bulion, se incubează la 37°C o oră, după care se centrifughează şi filtrează întocmai ca şi în cazul precedent.

Din apa de canal: într-un flacon de 1000 ml se pun 100 ml mediu nutritiv şi 200 ml apă de cercetat. Amestecul se însămînţează cu o bacterie sensibilă, nelizogenă, pentru care se caută bacteriofagul respectiv. După o incubaţie de 18—24 ore la 37°C se separă bacteriofagul prin filtrare.

Din culturile lizogene: cultura bacteriană în mediu lichid, obţinută prin incubaţie la temperatura şi pe o durată preferată de specia respectivă, este debarasată de corpii bacterieni prin centrifugare (20 minute la 2000—3000 t/minut) sau prin filtrare. Se poate recurge şi la o încălzire de 30 de minute la 57—58°. În cazul culturilor sporogene bacteriile se elimină prin filtrare sau se distrug cu ajutorul substanţelor bactericide (mertiolatul 1/5 000—1/10 000).

Punerea în evidenţă a prezenţei fagilor se poate face prin metode diferite.

Conform unei prime metode, germenii sensibili şi nelizogeni (dacă este posibil tulpini standard) se însămînţează abundent pe suprafaţa agarului din plăci Petri. Excesul de lichid se absoarbe cu pipeta şi se

înlătură, iar placa este lăsată descoperită, pentru zvîntare timp de 15—20 minute la termostat sau în apropierea flăcării. Apoi se depun pe suprafața însămînțată, picături din materialul presupus a conține fagi, în puncte distanțate (6—8 puncte pe o placă), însemnîndu-se pe fundul plăcii, locul însămînțat și indicativul tulpinii însămînțate. Placa se pune la incubat (de obicei la 37°C la termostat) și după 20—24 de ore se face citirea. În locurile unde s-a însămînțat inoculul conținînd fagi activi, se produce liza culturii, zona apărînd lipsită de colonii bacteriene (plajă).

O altă metodă preconizează însămînțarea în dublu strat de agar. În acest caz, se toarnă un strat de agar 2% topit și răcit la 45°C, în plăci Petri. Se lasă să se solidifice. Paralel, se pregătesc tuburi cu cîte 1—2 ml agar moale (0,7%) topit și răcit la 45°C. Acestea se însămînțează cu cîteva picături din cultura de 24 de ore din tulpina bacteriană sensibilă, menținîndu-se în continuare la 45°C.

În tuburile astfel însămînțate se adaugă filtratul presupus a conține bacteriofagul cercetat, după care conținutul fiecărui tub se toarnă în plăcile conținînd stratul de agar 2% solidificat. Se incubează 24 de ore la 37°C.

În cazul că în filtratul adăugat există fagi activi, în plăci vor apărea zone de liză, numite plaje, avînd dimensiuni variabile în funcție de capacitatea litică de care dispun.

Pentru a izola bacteriofagul în cultură pură, din aceste plaje se face transplantarea, cu ajutorul unei anse sterile cu care se atinge centrul unei plaje, după care se introduce într-o cultură tînără în bulion, a aceleiași tulpini bacteriene care s-a folosit inițial. Se incubează 24 de ore la 37°C și dacă cultura se clarifică se deduce că bacteriofagul a fost izolat.

Pentru a păstra tulpinile de bacteriofagi izolate se recomandă spălarea cu bulion a culturii pe agar a tulpinii bacteriene sensibile, menținerea timp de 90—120 minute la 37°C. Se adaugă fagul, se ține la termostat 24 de ore și apoi bacteriile se distrug prin încălzire (o oră la 59—60°C) sau se elimină prin filtrare.

Titrarea bacteriofagilor necesită: culturi lizosensibile, fagi activi și medii de cultură convenabile.

— Culturile lizosensibile trebuie să fie în prealabil bine controlate. Pentru cercetări de precizie este preferabil să se folosească tulpini standardizate. Acestea se cultivă pe agar și din culturile de 24 de ore se fac suspensii în bulion, care se țin 90—120 minute la 37°C și apoi se însămînțează pe plăci Petri cu agar. Aceasta se face în mai multe zone circulare (8—12) avînd diametrul de 1 cm și fiind marcate pe fundul plăcii. După însămînțare, placa întredeschisă este ținută la 37°C timp de 15—20 minute, timp în care apa din picătura însămînțată se evaporă, iar germenii însămînțați intră în faza logaritmică de multiplicare. Apoi, în fiecare zonă însămînțată cu bacterii se amplasează cu o ansă standard (5 mm diametru) diluțiile de bacteriofag.

— Fagul activ este în general reprezentat prin mediul lichid obținut prin filtrarea unei culturi bacteriene în care s-au produs procese de liză bacteriofagică. În vederea titrării sale, fagul este diluat din 10 în 10 în bulion. Fiecare diluție este însămînțată pe o zonă de cultură după tehnica enunțată.

— *Mediul de cultură* variază în raport cu specia bacteriană cu care se lucrează. În general se folosesc medii care oferă cele mai bune condiții de dezvoltare.

Pentru titrarea propriu-zisă se pot folosi diferite tehnici:

O primă tehnică constă în însămînțarea unei anumite cantități din diluțiile seriate de bacteriofagi în dublu strat de agar. În acest scop,

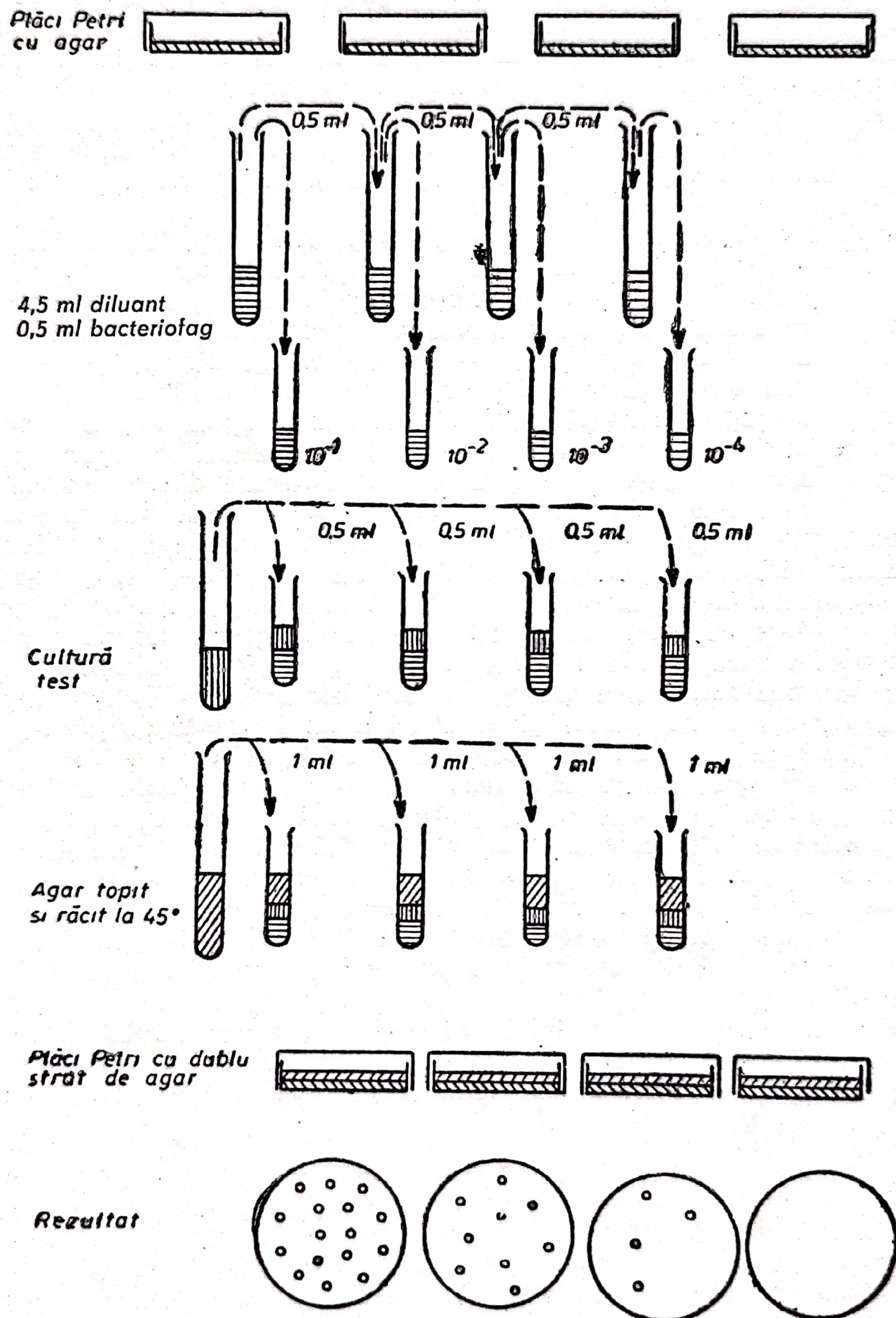


Fig. 104 — Schema titrării bacteriofagilor prin metoda dublului strat de agar

se toarnă mai întîi agar 2% în atîtea plăci cîte diluţii de bacteriofag urmează să se folosească (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} etc.). În tuburi de reacţie se fac aceste diluţii, punîndu-se iniţial 4,5 ml bulion în fiecare tub. Apoi se pun 0,5 ml filtrat care conţine bacteriofag, în primul tub, se omogenizează şi se trec 0,5 ml în tubul al doilea. După omogenizare se trec 0,5 ml în al treilea, ş.a.m.d.

Peste diluţia de bacteriofag se adaugă cîte 0,5 ml din cultura bacteriană-test, iar apoi cîte 1 ml de agar topit şi răcit la 45°C. Se omogenizează şi se toarnă peste stratul de agar 2% solidificat. Plăcile astfel însămînţate se pun la termostat şi după 24 de ore se face citirea, apreciindu-se numărul de plaje din plăcile însămînţate cu diluţii diferite de bacteriofag. Titrul se exprimă prin numărul de PFU (plaque forming units = unităţi formatoare de plaje) pe ml şi se obţine înmulţind numărul plajelor cu diluţia.

După o altă tehnică se depune cîte o picătură din fiecare diluţie de bacteriofag pe suprafaţa unei plăci însămînţate în gazon, cu specia bacteriană sensibilă (fundul plăcii se împarte prin linii în suprafeţe pătrate în centrul cărora se dispune picătura de bacteriofag diluat). Plăcile se incubează la termostat şi după 6—24 de ore se face citirea, apreciindu-se diluţia maximă activă (în care există cel puţin o zonă de liză).

Tipizarea fagică constă în identificarea unor specii sau a unor tulpini bacteriene cu ajutorul fagilor specifici. Se bazează pe faptul că fagii dispun de o specificitate strictă, în sensul că fiecare din ei este adaptat la parazitismul unei anumite specii bacteriene. Metoda este una dintre cele mai utile în procesul de tipizare a multor germeni bacterieni, ea prezentînd, în acelaşi timp, şi o deosebită importanţă din punct de vedere epidemiologic, întrucît permite identificarea surselor de infecţie. Se înţelege că efectuarea acestor tipizări se poate realiza numai în laboratoarele care dispun de colecţii (seturi) de fagi suficiente.

În vederea testării, se procedează întîi conform unei tehnici expeditive, la desenarea pe fundul plăcii Petri a unui număr de pătrate egal cu numărul de fagi care urmează a fi folosiţi. În placă se toarnă apoi mediul de cultură şi după solidificarea acestuia, se însămînţează tulpina de cercetat. Se lasă apoi placa, cu capacul întredeschis, la termostat, pentru zvîntare şi în fine, se pune cîte o picătură din fiecare lizat fagic cu care se lucrează, în cîte un pătrat, avîndu-se grija de a se nota exact.

După incubare la termostat se notează fagii care au produs plaje în gazonul de cultură bacteriană. Tipul fagic se stabileşte deci după tulpina de fag faţă de care tulpina bacteriană respectivă se dovedeşte a fi sensibilă.

Prin *lizotipie* este posibilă diferenţierea unor tulpini bacteriene aparţinînd aceleiaşi specii bacteriene care din punct de vedere biochimic şi serologic sînt întru totul identice (de exemplu în cazul salmonelelor, stafilococilor etc.).

Metode de examinare a rickettsiilor şi chlamidiilor

Rickettsiile şi chlamidiile (bedsonii, pararickettsii, miagawanelle, neorickettsii) sînt microorganisme situate la limita dintre bacterii şi virusuri şi avînd o serie de însuşiri comune atît cu unele cît şi cu celelalte. Ele sînt observabile la microscopul de lumină, apărînd ca formaţiuni pleiomorfe, dar mai ales de aspect cocobaciliar.

Sînt imobile, necapsulate, nesporulate.

Se colorează cu compuşi anilinici, în special cu fucsina, prezentînd un grad redus de acidorezistenţă.

Traversează unele filtre bacteriologice (Seitz cu plăci EK), dar cu scăderea considerabilă a titrului în corpi rickettsieni.

Colorarea rickettsiilor şi chlamidiilor se poate face folosindu-se una din metodele speciale expuse anterior: Giemsa-Romanovski, Macchiavello, Stamp, Castanneda etc.

Punerea în evidenţă a corpilor rickettsieni reuşeşte fie din produse patologice brute (raclate conjunctivale în cazul rickettsiozei oculare a rumegătoarelor, placentă, scurgeri uterine, avortoni în cazul avorturilor de această natură etc.), din sacul vitelin al ouălor inoculate cu material patologic etc. Indiferent de provenienţă, colorarea prin una din metodele amintite, pune în evidenţă formaţiuni colorate în roşu rubiniu, intra- sau extracelulare, contrastînd cu restul formaţiunilor din frotiu. Pentru reuşita examenului microscopic este important să se respecte cîteva condiţii:

— frotiurile să fie cît mai subţiri;

— coloranţii să fie de bună calitate şi bine filtraţi, pentru a nu conţine impurităţi şi mai ales precipitate;

— să se facă o spălare temeinică a frotiurilor pentru a îndepărta eventualele precipitate;

— microscopul să aibă o capacitate de rezoluţie ridicată.

Cultivarea rickettsiilor şi chlamidiilor se face, aşa după cum s-a mai amintit, numai pe celule vii. În mod curent, se foloseşte cultivarea pe ouă embrionate şi inocularea la animale de experienţă.

În cazul ovoculturilor calea cea mai propice este cea intravitelină. Vîrsta la care se inoculează este a 5—7-a (maximum a 9-a) zi de incubaţie. Ouăle cu embrionii morţi pînă la 4 zile după inoculare se elimină. De la ceilalţi, care mor între a 4-a şi a 10-a zi, se recoltează sacul vitelin şi se face controlul prezenţei rickettsiilor, prin examen microscopic. Frotiurile se practică din pereţii sacului vitelin.

Infecţia experimentală. *În cazul rickettsiilor* se foloseşte cel mai frecvent cobaiul, care este mai sensibil. Inoculat cu material virulent reacţionează prin tulburări generale, cu hipertermie şi în unele cazuri, prin peritonită (reacţia Weil—Mooser) care este caracteristică pentru unele specii de rickettsii.

Pentru inoculare materialul patologic se mojarează, se suspendă în soluţie fiziologică, în proporţie de 1/10, se centrifughează 5 minute la 1500 turaţii/minut. Pentru aseptizare se foloseşte de preferinţă streptomicina, cunoscînd că penicilina în doză de peste 400 UI atrage moartea cobailor, ceea ce desigur, constituie sursă de erori. Supernatantul se inoculează pe cale subcutanată, în cantitate de 2—5 ml la cobai în greutate de cca 200 g.

Inocularea este urmată de termometria zilnică şi recoltarea de sînge prin puncţie cardiacă în perioada curbei termice maxime (peste 39,5°C, în general la 4—7 zile de la inoculare). Animalele se sacrifică în momentul scăderii temperaturii. Pentru transmitere în serie se folosesc suspensii de splină şi glande suprarenale. Într-o etapă următoare, se procedează la inocularea de embrioni de găină pe cale intravitelină, cu sînge şi respectiv splină şi glande suprarenale de la cobai infectaţi.

În cazul chlamidiilor infecţia experimentală reuşeşte cel mai bine pe şoarece. Inoculaţi pe cale intranasală cu 3—4 picături de material patologic aceştia mor în 2—10 zile. Dacă moartea nu se produce, ei se sacrifică şi din pulmonul lor se fac suspensii care se reinoculează la alte animale pe aceeaşi cale (pasaj orb). Dacă după 3 pasaje oarbe, animalele nu reproduc boala şi deci nu mor, se consideră că materialul patologic nu a conţinut agenţi chlamidieni.

Aseptizarea materialului se face numai cu streptomicină sau amestec de streptomicină-sulfamide. Penicilina este contraindicată deoarece chlamidiile sînt sensibile faţă de acest antibiotic.

În cazul cînd pentru izolarea chlamidiilor se folosesc fecalele unor specii de animale suspecte, se procedează mai întîi la triturarea temeinică a lor, într-un mojar steril şi suspendarea în proporţie de 10% în bulion. Se supune apoi suspensia unei centrifugări de 20 de minute la 3000 turaţii/minut. Supernatantul se decantează, se recentrifughează timp de 30 de minute la 4000 T/minut, se decantează din nou şi la supernatant se adaugă 1000 gamma streptomicină pe ml. Se pune apoi 2 ore la termostat, apoi o oră la frigider şi se inoculează pe cale intraperitoneală la cobai.

Examenele serologice se folosesc atît pentru identificarea rickettsiilor izolate cît şi pentru decelarea anticorpilor specifici în sîngele animalelor bolnave sau trecute prin boală.

1 — *Hemoaglutinarea rapidă* — folosită mai ales în diagnosticul tifosului exantematic la om — se bazează pe proprietatea pe care o are sîngele indivizilor bolnavi sau trecuţi prin boală de a aglutina suspensiile de *Proteus* tulpina X_{19}. De fapt aceasta este o paraaglutinare. Tehnica reacţiei constă în următoarele: pe o lamă se pun 3 picături de sînge suspect şi se lasă să se usuce la temperatura camerei. La prima picătură se adaugă 0,02 ml suspensie alcoolată de *Proteus* X_{19}, la a doua 0,04 ml şi la a treia 0,08 ml. Citirea se face după 1—30 minute şi constă în aprecierea aglutinării particulelor bacteriene, care apar sub formă de grunji,

întîi la periferia picăturilor. În funcţie de concentraţia în anticorpi a sîngelui aglutinarea poate apărea în una sau mai multe din picături.

Reacţia se poate executa şi cu suspensii formolate de corpi rickettsieni obţinuţi prin cultivarea pe ouă embrionate. Se pun în contact pe o lamă o picătură de ser — în diluţia dorită — şi o picătură de antigen. Amestecul se lasă la temperatura camerei în atmosferă umedă (într-o placă Petri avînd pe capac o hîrtie de filtru îmbibată în apă distilată) timp de 10 ore. Se usucă apoi la 37°C şi se colorează prin metoda May Grünwald Giemsa. Preparatele se examinează apoi la microscop. Cînd reacţia este negativă particulele rickettsiene apar dispersate uniform în cîmpul microscopic, iar în caz de reacţie pozitivă, ele apar grupate în grămezi, mai mult sau mai puţin mari (10—15 particule).

2 — *Aglutinarea lentă în tuburi* numită şi reacţia Weil—Felix, se foloseşte în diagnosticul tifosului exantematic şi al tifosului murin.

Ca antigen, s-au folosit iniţial suspensii de *Proteus* X_{19}, iar în ultimul timp culturi rickettsiene obţinute prin cultivare *in vitro* sau *in vivo*. Anticorpii ating nivele semnificative după 7—9 zile de la infecţie. În medicina veterinară s-au folosit antigene rickettsiene obţinute prin cultivarea pe ouă embrionate sau din pulmonii de la animale inoculate pe cale respiratorie.

3 — *Reacţia de fixare a complementului* este una din cele mai precise şi, ca urmare, mai frecvent folosite în diagnosticul infecţiilor rickettsiene şi chlamidiene. Principiul reacţiei ca şi tehnica sînt aceleaşi ca şi în cazul infecţiilor bacteriene, diferind doar antigenul. Anticorpii fixatori apar în jurul zilei a 7-a de la infecţie, titrul lor crescînd progresiv, pentru ca între zilele a 20-a şi 25-a să atingă un titru maxim. Ei pot persista perioade îndelungate, luni şi chiar ani de zile, însă la nivele mai scăzute.

4 — *Reacţia de seroneutralizare* se bazează pe capacitatea pe care o au anticorpii corespunzători din serul animalelor imunizate, de a neutraliza valenţele patogene ale rickettsiilor şi respectiv chlamidiilor. Testarea se face prin inoculare, fie în ouă embrionate fie la animale de experienţă receptive. Materialul de inoculat se pune în acest caz în contact cu antiserul corespunzător, timp de 30 minute înainte de inoculare.

5 — *Reacţia de precipitare* presupune folosirea de seruri hiperimune, care, puse în contact cu produse patologice de la indivizi bolnavi sau trecuţi prin boală (urină, suspensii rickettsiene obţinute prin izolarea cu ajutorul uneia din metodele de cultivare), produc un inel de precipitare albicios, la nivelul zonei de contact al celor două lichide (reacţia se desfăşoară în tuburi de reacţie).

6 — *Imunofluorescenţa* se bazează pe folosirea anticorpilor marcaţi cu o substanţă fluorescentă şi este una din metodele care cîştigă teren în ultimul timp, datorită fidelităţii ei. Principalele avantaje ale metodei constă în precocitatea diagnosticului, operativitatea şi specificitatea reacţiei. Iniţiatorul metodei este C O O N S şi col. (1942). Principiile şi tehnica sînt asemănătoare cu cele folosite în cazul altor microorganisme.

*
* *

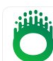
În continuare sînt date cîteva elemente de tehnică referitoare la modul de preparare a unor antigeni rickettsieni, aceştia stînd la baza reacţiilor serologice folosite în diagnosticul infecţiilor provocate de aceşti agenţi patogeni.

Prepararea antigenului rickettsian se face din saci vitelini provenind de la embrionii inoculaţi pe cale intravitelină. Pentru recoltarea sacilor vitelini, ouăle se pun în tăvi speciale, prevăzute cu suporturi în care ele se pot aşeza în poziţia dorită (în cazul de faţă cu camera de aer la partea superioară). Se face apoi badijonarea părţii superioare cu tinctură de iod (de două ori). Se taie coaja în jurul bazei camerei de aer, se sparge membrana cochilieră (cu o foarfecă sterilă, flambată în prealabil). Se goleşte conţinutul oului într-o placă Petri sterilă. Se detaşează membrana corio-alantoidiană, după care se recoltează sacul vitelin, avîndu-se grija de a se îndepărta pe cît posibil mai mult din gălbenuşul pe care-l conţine. Se face apoi triturarea în mojare sterile sau cu ajutorul omogenizatorului electric. Se suspensionează în soluţia fiziologică (un sac vitelin la 20 ml soluţie fiziologică). Suspensia obţinută se formolează 2‰ şi se ţine 6—10 zile la +4°C pentru inactivare. După acest interval, suspensia se tratează cu eter sulfuric în părţi egale, într-o pîlnie de separaţie, pentru extracţia grăsimilor şi îndepărtarea resturilor celulare. Se lasă în repaus 24 de ore la +4°C. Stratul apos ce se alege la partea inferioară a pîlniei conţine în suspensie corpii rickettsieni (antigenul corpuscular şi fragmente inframicroscopice din stratul periferic capsular al rickettsiilor, deci antigenul solubil). Separarea celor două antigene se face prin centrifugarea stratului apos, timp de o oră la 18 000 turaţii/minut. După centrifugare, antigenul solubil rămîne în lichidul supernatant, care este decantat şi titrat, iar corpii rickettsieni se depun sub forma unui sediment la fundul tubului. Prepararea antigenului corpuscular se face prin resuspendarea acestui sediment în cîţiva ml soluţie fiziologică. Antigenul astfel preparat este stabil mai multe luni, dacă conservarea se face în condiţii corespunzătoare (steril, la întuneric şi rece).

În practica obişnuită, pentru RFC se folosesc suspensii antigenice conţinînd atît antigen solubil cît şi corpuscular, fiind mai uşor de preparat.

În cazul antigenului ornitozic, suspensia de sac vitelin se încălzeşte 30 de minute la 100°C. După răcire se adaugă eter în raport de 1/10, se omogenizează şi se lasă la frigider la +4°C timp de 2 ore. Fracţiunea eterică, de culoare galbenă, se recoltează într-un balon cu tubulură laterală şi cu perle, iar suspensia de saci vitelini se supune unei a doua extracţii cu eter în raport de 1/3 timp de o oră. Se amestecă apoi cele două fracţiuni, iar eterul se evaporă la baia de apă. Pe fundul tubului, rămîne un praf galben, peste care se adaugă acetonă pură, încălzită la 55°C, în volum egal cu cantitatea de eter folosită iniţial. Se agită bine lăsînd totul la baia de apă la 55°C timp de o oră. După aceasta acetona se decantează, iar resturile ei se îndepărtează la baia de apă la 37°C. Sedimentului rămas i se adaugă o soluţie salină tamponată la pH 7,1 cîte 5 ml pentru ficare sac. Omogenizarea se realizează prin agitare cu perle. Antigenul este un lichid opalescent de culoare albă lăptoasă. Se repartizează în flacoane sterile şi se mertiolează 1/10 000.

În cazul infecțiilor cu *R. mooseri* (tipul murin) antigenul rickettsian se prepară din țesuturi pulmonare de șoarece sau iepure. În acest scop, în faza maximă a pneumoniei animalelor inoculate pe cale respiratorie cu material virulent, se face recoltarea pulmonilor, triturarea și suspensionarea în soluție fiziologică tamponată și formolată 0,2%. Un pulmon de șoarece cîntărind 300 mg este diluat în 20 ml lichid. Pentru purificare, se decantează țesuturile triturate cu ajutorul unui tub de 17 mm, la 44°C, timp de 8 zile. Rickettsiile vor rămîne în suspensie.



Examenul histopatologic

Diferite stări de boală provocate de procese infecţioase, tulburări de metabolism, intoxicaţii, carenţe, tumori etc. se soldează cu instalarea unor alteraţii tisulare sau celulare, capabile prin natura lor să furnizeze importante date pentru diagnostic. Uneori, aceste modificări sînt atît de caracteristice încît permit, chiar numai prin interpretarea lor, punerea unui diagnostic de certitudine (turbare, tuberculoză, morvă).

Pentru a efectua un examen histopatologic corect, de o deosebită importanţă este recoltarea materialului patologic de examinat. Aceasta se poate face, aşa cum s-a amintit, de la animalele în viaţă, sacrificate în scop de diagnostic şi după moarte.

Recoltarea pe animalul viu se poate face prin biopsie şi prin raclaj (suprafeţele cutanate, mucoase) şi are avantajul că permite interpretarea modificărilor fără a interveni procesele de alteraţie postmortală şi fără a pierde animalul.

Recoltarea prin sacrificarea în scop de diagnostic are, pe lîngă avantajul că prelevarea pieselor se poate face imediat, evitîndu-se deci procesele alterative şi avantajul că se pot recolta ţesuturi care pe animalul viu nu sînt accesibile (creier, glande cu secreţie internă, organe, seroase).

Recoltarea pe animalul mort trebuie să se realizeze cît mai curînd după moarte (primele 15 minute dacă e posibil) pentru acelaşi motiv — de a se evita modificările structurale cauzate de alteraţiile cadaverice.

În orice recoltare, se va evita utilizarea de instrumente neascuţite, strivirile de ţesuturi prin compresiune şi tracţiuni, iar piesele vor avea mărimi care să permită o bună prelucrare ulterioară (3—5 mm grosime şi 1—3 cm lăţime).

Examinarea acestor piese se poate face în stare proaspătă sau după o prealabilă fixare pe cale chimică.

Examinarea în stare proaspătă se poate face:

— între lamă şi lamelă;

— prin compresiune între două lame (de exemplu examenul trichineloscopic);

— în picătură suspendată (cameră umedă, mai rar folosită în histopatologie);

— prin secţiuni congelate.

Dintre acestea mai importantă din punct de vedere histopatologic este examinarea secţiunilor obţinute cu ajutorul microtomului la gheaţă.

Țesuturile proaspete fiind prea moi nu s-ar putea secționa ca atare în secțiuni foarte subțiri. Prin congelare însă, datorită apei pe care o conțin, ele dobîndesc o consistență crescută și se pot obține secțiuni foarte subțiri, transparente, examinabile ca atare, prin contrast de fază sau prin colorare ulterioară, permițînd o bună examinare a modificărilor existente. Această metodă prezintă avantaje deosebite în următoarele cazuri:

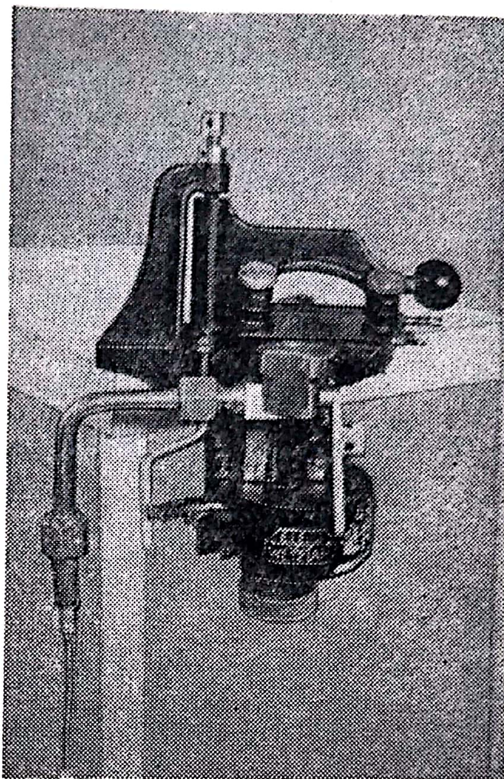


Fig. 105 — Microtomul manual de secționare la gheață

— în situațiile de urgență, cînd se impune stabilirea cît mai precoce a diagnosticului (de exemplu, în oncologie, pentru precizarea naturii unei tumori, în diagnosticul turbării etc.), rezultatele putînd fi obținute în 15—30 minute;

— cînd se urmărește evidențierea unor componenți tisulari sau celulari care pot fi solubilizați de către reactivii utilizați în prelucrările premergătoare includerii pieselor (grăsimi, lipoizi);

— pentru unele cercetări de histologie, care nu permit tratarea prealabilă cu diferite substanțe chimice;

— cînd secțiunile urmează să fie colorate sau impregnate prin metode speciale.

Principiul secționării prin congelare se bazează pe absorbția masivă de căldură în momentul trecerii în stare de vapori a unui gaz lichefiat (acid carbonic) aflat sub presiunea de cca 60 atmosfere într-o bombă specială cu robinet. Prin detenta bruscă a bioxidului de carbon rezultat, se produce congelarea foarte rapidă a pieselor.

Bomba cu acid carbonic este pusă în legătură cu microtomul de congelație într-un tub metalic perfect închis cu ajutorul unui robinet. Bomba se așază pe un suport special, cu robinetul în jos (niciodată cu robinetul în sus).

Microtomul de congelare este prevăzut cu un portobiect reglabil, putînd fi ridicat sau coborît prin intermediul unei manivele.

În timpul secționării, avansarea pe verticală a portobiectului se face automat, prin intermediul dispozitivului micrometric. Fiecare cursă completă a cuțitului realizează ridicarea portobiectului cu un număr de microni, în prealabil fixat prin dispozitivul micrometric.

Cuțitul se fixează pe un suport special, situat deasupra portobiectului, executînd mișcări orizontale în timpul secționării. El este de asemenea mobil în jurul unui ax și poate fi mișcat în arc de cerc cu ajutorul unui mîner prelungitor, ceea ce permite orientarea lui sub un unghi corespunzător față de piesa fixată pe portobiect.

Tehnica secționării la gheață

În primul rînd, se pune pe portobiect o rondelă de hîrtie de filtru îmbibată cu apă, pe care se așază apoi piesa ce urmează a fi secționată, orientîndu-se într-o poziție convenabilă.

Se deschide robinetul bombei de acid carbonic, după care se deschide pentru cîteva secunde robinetul de gaz al microtomului, realizînd în acest fel răcirea portobiectului și fixarea piesei de acesta, prin congelarea apei existente pe suport.

Pentru congelarea propriu-zisă a piesei, aceasta se acoperă cu un recipient de sticlă sau material plastic (pahare sau capace de la pahare Borel) și se acționează din nou robinetul de gaz, prin deschideri și închideri succesive, de scurtă durată, pînă cînd piesa este bine acoperită cu gheață carbonică ce se formează. Este necesar să se realizeze o congelare optimă a piesei, în sensul de a nu fi nici prea congelată dar nici insuficient congelată. Acest lucru se constată prin tatonări (secționări de probă). Congelarea prea puternică face ca piesele să devină sfărîmicioase la secționare, în timp ce congelarea insuficientă a acestora are ca rezultat obținerea unor secțiuni prea groase și neuniforme. Aceste deficiențe pot fi corectate în primul caz așteptînd ca piesa să se mai dezghețe și apoi, se reîncepe secționarea, sau repetînd operațiunea de congelare, în cel de al doilea caz.

În vederea secționării propriu-zise, se ridică portobiectul pînă cînd suprafața piesei fixate pe el este foarte aproape de cuțit, dar nu atît de aproape încît acesta să taie de la prima acționare (există riscul de a pierde o porțiune importantă din piesă), avînd în vedere că pentru început, dispozitivul micrometric se fixează pentru un grosisment mai mare (50—100 microni). După ce se constată că s-a pătruns suficient în piesă, se reglează definitiv dispozitivul micrometric la numărul de microni la care se dorește să se obțină secțiunile (trebuie menționat că este destul de dificil să se obțină secțiuni mai subțiri de 10 microni, mai ales dacă este vorba de țesuturi cu consistență mai mare). Pentru a obține secțiuni uniforme, la o anumită grosime, trebuie să imprimăm cuțitului mișcări destul de rapide, la curse complete, asigurînd în acest fel acționarea uniformă a dispozitivului micrometric. În caz contrar, se obțin secțiuni neuniforme ca grosime. O cursă completă a cuțitului realizează o singură secțiune.

Dacă în timpul secționării se constată că piesa și-a pierdut din consistența realizată prin congelare este necesar ca ea să fie recongelată.

Secțiunile obținute se culeg una cîte una, cu pulpa degetului umezită, cu grijă să nu fie strivite și se depun într-un vas cu apă distilată (plăci Petri, capace de la pahare Borel, sticle de ceasornic sau cristalizoare). În contact cu apa, secțiunile se dezgheață și se întind, putîndu-se astfel aprecia calitatea lor. Se înțelege că dacă piesele aparțin unor cazuri diferite, secțiunile vor fi repartizate în recipiente separate, avînd grija de a le individualiza.

În mod normal, secțiunile la gheață trebuie prelucrate în continuare (colorate etc.) în următoarele ore, pentrucă menținute prea mult timp în apă se deteriorează. Dacă acest lucru nu este posibil, atunci vor fi păstrate fie într-o soluție de formol 10%, fie la frigider, dar nici în acest caz nu mai mult de 1—2 zile.

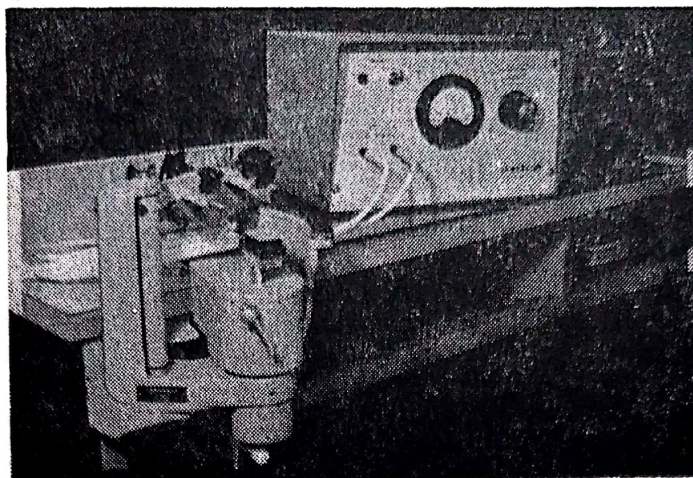


Fig. 106 — Microtom electric de secționare la gheață

După ce operațiunea de secționare s-a terminat, se închide robinetul bombei cu acid carbonic, deschizîndu-se însă robinetul microtomului, pentru evacuarea gazului rămas pe tuburi, după care și acest robinet va fi bine închis.

Examenul pe țesuturi fixate

Datorită faptului că țesuturile în stare proaspătă nu oferă preparate de durată, ele alterîndu-se foarte repede după recoltare, s-a recurs la fixarea lor prin metode chimice, care realizează oprirea bruscă a manifestărilor vitale și conservarea structurilor în faza în care erau în momentul recoltării. Fixarea ajută totodată la diferențierea optică a diferitelor părți constitutive ale țesuturilor și celulelor, prin folosirea substanțelor colorante. Agenții fixatori chimici pot fi folosiți singuri sau în combinații complexe. O condiție esențială, indiferent de formula în care se folosesc, este ca ei să păstreze o structură cît mai apropiată de cea din starea vie. De asemenea, ei trebuie să aibă capacitatea de a pătrunde în profunzimea țesuturilor, pentru a realiza o fixare uniformă a întregii mase tisulare de examinat. Cu cît acești fixatori pătrund mai repede în profunzime, cu atît țesuturile sînt surprinse într-o stare mai puțin modificată. Fixatorul mai trebuie să fie ușor acid (cei alcalini ar produce modificări și înmuierea pieselor), să întărească moderat piesa și, în sfîrșit, să permită colorația ulterioară.

Cantitatea de fixator trebuie să fie în general de 50—100 de ori mai mare decît a piesei. Durata de fixare este variabilă cu soluția fixatoare, cu grosimea și natura piesei de fixat. Ea durează în general de la cîteva ore pînă la cîteva zile.

După proveniență și după proprietățile lor chimice, fixatorii se împart în mai multe categorii:

— fixatori acizi minerali (acidul osmic);
— fixatori organici (acidul acetic, picric);

— fixatori reducători (alcoolul etilic, metilic, formolul);
— săruri ale metalelor grele (biclorura de mercur, bicromații).

Din alt punct de vedere, fixatorii pot fi:

— amestecuri apoase (formolul, lichidul Bouin, Orth etc.);
— amestecuri anhidre (alcool absolut, acetonă, lichidul Carnoy etc.).

Dintre toți aceștia cel mai larg folosit în practica histopatologică și în același timp cel mai economic este formolul. El este un bun pătrunzător, păstrează foarte bine structurile și permite colorații ulterioare, chiar după o acțiune mai îndelungată. În plus, prin fixarea cu formol, grăsimile și lipoizii nu sînt dizolvați, fapt care-l face să fie întrebuințat în cercetările de histopatologie și pentru studiul sistemului nervos. Concentrația în care se utilizează este de 4—10% în apă de robinet sau distilată.

Dintre fixatorii compuși pot fi amintiți cîțiva care sînt mai frecvent folosiți: lichidul Flemming (conține acid cromic, osmic și acetic), lichidul Bouin (conține acid picric, formol, acid acetic) lichidul Müller (cu bicromat de potasiu și sulfat de sodiu), lichidul Carnoy (cu alcool absolut, cloroform și acid acetic), lichidul Orth (cu lichidul Müller și formol) etc. După fixarea în asemenea fixatori, este necesar să se facă o spălare temeinică a pieselor, pentru ca substanțele respective să nu atace cuțitele și celelalte piese ale microtomului.

Trebuie menționat că în vederea secționării la gheață, piesele fixate în amestecuri apoase trebuie să fie spălate temeinic cu apă curentă înainte de congelare, pentru a evita sfărîmarea lor în timpul secționării, din cauza urmelor de fixator. Dacă s-au folosit fixatori anhidri (de exemplu lichidul Carnoy) piesele vor fi supuse unei rehidratări înainte de congelare.

Pentru o mai bună incluzie și ulterior secționare, este bine ca piesele introduse în fixator să fie modelate după 24—48 ore de fixare. Operațiunea se face cu instrumente bine ascuțite sau cu lame de bărbierit, imprimîndu-se piesei o formă geometrică definitivă pentru incluzie și renunțîndu-se, eventual, la segmentele care nu sînt necesare. Prin aceasta se facilitează și pătrunderea în continuare a fixatorului în profunzimea țesuturilor și manipularea mai facilă atît în cursul secționării, cît și al operațiunilor ulterioare acesteia.

Amestecuri fixatoare apoase:

1 — *Soluția de formol 1/4*

— formaldehidă 40% p.a. — o parte
— apă robinet — 4 părți

2 — *Lichidul Bouin*

— soluție saturată apoasă de acid picric — 15,0 ml
— formaldehidă 40% p.a. — 5,0 ml
— acid acetic glacial — 1,0 ml

Se prepară ex tempore. Durata fixării: 12—24 ore.
Nu este indicat pentru organele hematopoetice din cauza acidului picric care hemolizează eritrocitele. Nu conservă grăsimile.

3 — *Amestecul Flemming* (cromoacetoosmic)

— acid cromic 1% 15,0 ml
— acid osmic 2% 4,0 ml
— acid acetic glacial 1,0 ml

Se prepară ex tempore. Pentru a nu se altera acidul osmic este bine să se dizolve 0,5 g tetraoxid de osmiu în 118,7 ml acid cromic 1%. În momentul folosirii, se adaugă 1 ml acid acetic glacial la 19 ml amestec.

Avînd o slabă difuzibilitate în țesuturi, nu se pretează decît pentru piese subțiri de cca 3 mm.

4 — *Lichidul Müller*

— bicromat de potasiu	2,0 g
— sulfat de sodiu	1,0 g
— apă distilată	100,0 ml

5 — *Lichidul Orth*

— lichid Müller	9 părți
— formol 40 vol.	1 parte

Durata fixării: 24—48 ore. După fixare, piesele se vor spăla cu apă curentă timp de 24 de ore.

6 — *Lichidul Dubosq-Brazil*

— acid picric	1,0 g
— alcool 80°	150,0 ml
— formol conc.	60,0 ml
— acid acetic glacial	15,0 ml

Acidul picric se dizolvă în alcool, iar formolul și acidul acetic se adaugă înainte de folosire. După fixare, piesele se trec direct în alcool 90%. Este foarte indicat în colorațiile pentru incluzii uratice.

7 — *Lichidul Zenker*

— bicromat de potasiu	2,5 g
— apă	100,0 ml
— sublimat	5,0 g
— sulfat de sodiu	1,0 g

La întrebuințare se adaugă 5% acid acetic glacial. Este indicat pentru cercetări histologice generale și mai ales pentru parenchime glandulare. Durata fixării este de 6—48 ore, după grosimea pieselor. Pătrunde foarte bine în țesuturi și favorizează toate colorațiile. O fixare prelungită alterează nucleii, dar evidențiază unele organite citoplasmatice.

Amestecuri fixatoare anhidre:

Lichidul Carnoy

— alcool absolut	6,0 ml
— cloroform p.a.	3,0 ml
— acid acetic	1,0 ml

Se prepară ex tempore. Durata fixării: 2—4 ore (pentru piese cu grosimea de 2—3 mm).

Amestec alcoolic

— alcool metilic	3 părți
— alcool etilic absolut	1 parte

Durata fixării: 12 ore

Piesele fixate pot fi secționate la rîndul lor prin congelare sau după incluzia în alte materiale special destinate acestui scop.

Metode de incluzie

Secționarea după o prealabilă incluzie prezintă o serie de avantaje față de metodele de examinare a pieselor în stare proaspătă sau după secționarea la microtomul de congelație. În primul rînd, se obțin secțiuni mult mai fine (2—5 microni), în al doilea rînd se pot secționa piese foarte mici, în al treilea, permite secțiuni seriate și examinări de finețe citologică, iar în al patrulea manipularea pieselor se face cu ușurință.

Metodele de incluzie se împart în două categorii: în medii apoase și medii anhidre

a) *Mediile apoase* se folosesc mai puțin, manipularea pieselor fiind greoaie. Dintre ele pot fi amintite guma arabică, săpunul, gelatina.

b) *Mediile anhidre* sînt cel mai larg folosite în practica actuală. Acestea presupun însă o prealabilă deshidratare a pieselor, impregnarea lor cu solvenți ai mediului și, în final, înglobarea în mediul respectiv. Dintre acestea cele mai folosite sînt celoidina, parafina, iar în ultimul timp, din ce în ce mai larg folosite, substanțele care polimerizează.

1 — **Incluzia în celoidină.** Celoidina — o nitroceluloză transparentă, elastică și solubilă în alcool și eter — se folosește pentru incluzii la rece.

Fiind un mediu anhidru, se impune ca piesele să fie în prealabil deshidratate. În acest scop, piesele fixate și spălate se introduc în băi succesive de alcool etilic de concentrații crescînde (50°, 70°, 90°, 96° și două băi de alcool absolut). Durata șederii pieselor în fiecare baie este variabilă cu natura piesei și volumul ei. Pentru piesele de 1—2 mm fiecare baie necesită 1—2 ore, în timp ce pentru cele de 4—5 mm se prelungește la 4—5 ore.

Urmează apoi impregnarea pieselor cu alcool absolut + eter sulfuric (în părți egale) timp de 4—5 ore și, în fine, impregnarea cu soluția de celoidină 2%, 4% și 8%.

Prepararea soluțiilor de celoidină se face din plăci de celoidină care se găsesc în comerț, fragmentate cît mai mărunt și amestecate cu alcool + eter. De exemplu, pentru prepararea soluției 2%, se pun 20 g celoidină în 500 ml alcool absolut. După 24 de ore se adaugă 500 ml eter. Pentru a grăbi dizolvarea, din timp în timp, se agită recipientul respectiv. Celelalte soluții se prepară în același mod, doar mărind proporția de celoidină, la 4 și respectiv 8%.

Impregnarea are loc în vase mici, bine închise, în care se pun soluțiile de celoidină și în care se trec pe rînd piesele după impregnarea cu alcool absolut + eter. Cantitatea de celoidină a fiecărei băi trebuie să fie astfel aleasă încît să acopere piesele.

Durata impregnării este variabilă cu grosimea și natura pieselor: pentru cele de 2—3 mm este de 48 ore, în timp ce pentru cele de 4—5 mm se prelungește pînă la 3—7 zile. O ședere mai îndelungată în soluția de celoidină nu este dăunătoare.

Incluzia propriu-zisă se face în soluția de celoidină 8%, într-un recipient cu fund plat, variabil ca mărime după numărul pieselor ce urmează a fi incluse, cu grija ca celoidina să depășească înălțimea pieselor cu cca 2 cm.

Recipientul se aşază apoi într-un vas mai mare, care conţine acid sulfuric şi totul se pune sub un clopot de sticlă suficient de mare. După două ore, se retrage vasul cu acid sulfuric, lăsîndu-se numai cel cu celoidină. În această stare, piesele se lasă pînă la întărirea celoidinei datorită evaporării solvenţilor acesteia. Pentru a grăbi evaporarea, eventual, din două în două ore se ridică pentru cîteva minute clopotul de sticlă. Incluzia este terminată cînd celoidina s-a întărit la consistenţa unui cauciuc moale. Pentru a o întări şi mai mult, se pune vasul cu celoidină în altul conţinînd alcool 70° timp de 12—24 de ore. La sfîrşit, celoidina se taie în blocuri, cu grija ca în jurul pieselor să rămînă un strat de 2—3 cm celoidină. Pînă la secţionare blocurile se păstrează în alcool de 70°.

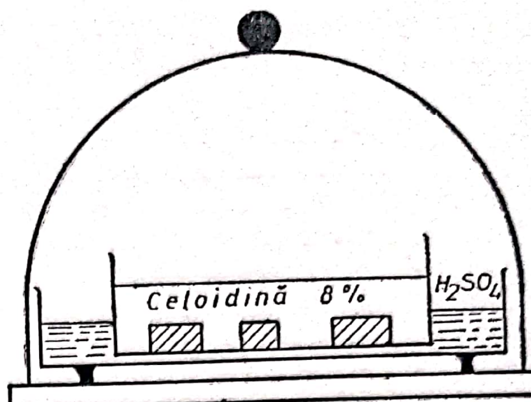


Fig. 107 — Incluzia la celoidină

2 — **Incluzia în parafină.** Parafina obţinută în procesul de distilare a petrolului este foarte larg folosită în laboratoarele de histopatologie pentru uşurinţa cu care se manipulează, pentru consistenţa ei care permite secţionarea în condiţii foarte bune.

Pentru lucrările de histopatologie, se pretează cel mai bine parafina transparentă cu punctul de fuziune situat între 54—56° (se evită parafina opacă, a cărei temperatură de topire este de 51—54°C). Pentru înlăturarea impurităţilor şi a componenţilor greu fuzibili este bine ca parafina să se fiarbă în apă 1—2 zile, stratul superficial înlăturîndu-se.

Tehnica de incluzie în parafină presupune următorii timpi:

a) *Deshidratarea piesei* se face în băi de alcool etilic de concentraţii crescînde (50°, 70°, 90°, 96° şi alcool absolut).

Durata şederii în aceste băi deshidratante este variabilă după natura şi volumul pieselor, în general 1 oră pentru fiecare mm de grosime.

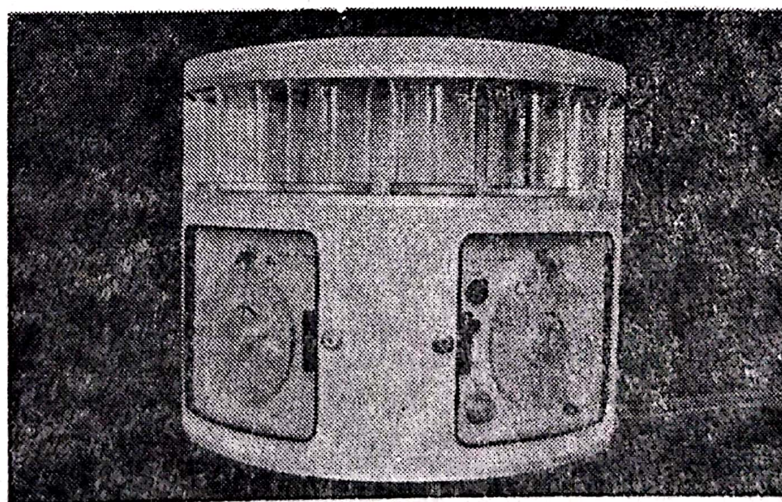


Fig. 108 — Dispozitiv automat de incluzie la parafină

Băile se pregătesc în borcane cu dop şlefuit, pe fundul cărora se pune cîte o rondelă de hîrtie de filtru sau un suport metalic, înalt de 1—2 cm.

b) *Impregnarea cu solvenţi ai parafinei* (clarificarea) urmăreşte înlocuirea alcoolului din piese cu un solvent care este miscibil cu parafina. Cel mai bun solvent este benzolul, dar pot fi folosite şi toluolul, xilolul, cloroformul. În acest scop se trece piesa deshidratată prin 2—3 băi de solvent, în vase bine închise. Dacă piesa nu este bine deshidratată în momentul introducerii ei în solvent se produce o dîră albicioasă. Dacă deshidratarea s-a făcut corect, piesa devine translucidă, mai întîi spre periferie, apoi din ce în ce mai mult spre centru. Durata băilor de clarificare depinde, ca şi a celor de deshidratare, de grosimea şi consistenţa piesei. De regulă, ea oscilează între 30 şi 90 minute. O prelungire a timpului de clarificare se soldează cu întărirea exagerată a ţesuturilor, acestea devenind sfărîmicioase la secţionare.

c) *Impregnarea cu parafină* trebuie făcută treptat ca şi în cazul celorlalte operaţiuni. O primă baie cu amestec de benzol + parafină în părţi egale, la 37°C, este urmată de 3 băi cu parafină pură încălzită la 56°C prin care piesele sînt trecute succesiv, cu ajutorul unor instrumente încălzite şi ele (prin ţinerea lor în etuva de 56°C). Durata acestor băi depinde şi ea de dimensiunile piesei, fiind de 1—3 ore în cazul primelor băi şi de 1/2 oră în cazul ultimei băi. Dacă este vorba de ţesuturi foarte uşor penetrabile (creier) durata de menţinere în aceste băi se scurtează. În general se poate lua ca durată medie a fiecărei băi, o oră pentru fiecare milimetru grosime.

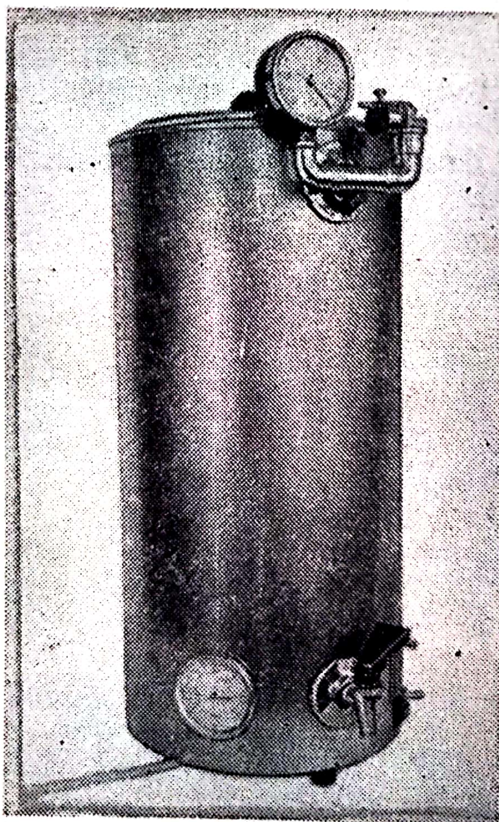
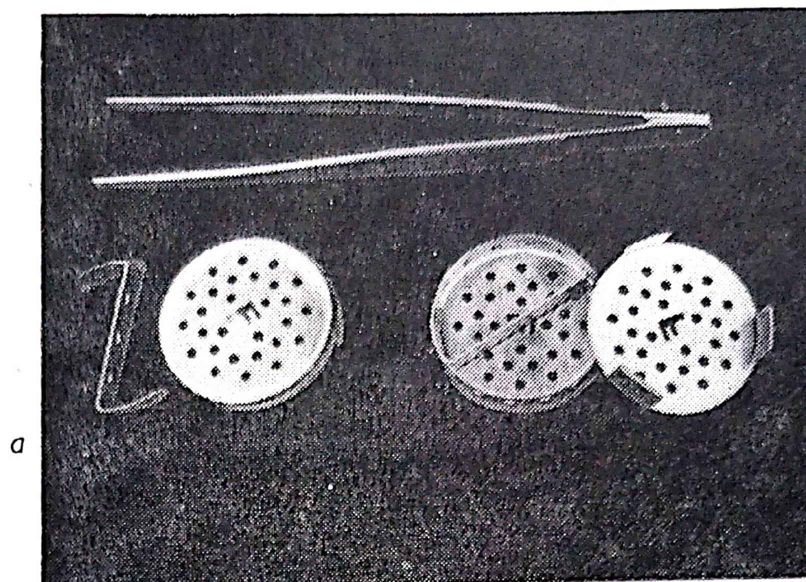


Fig. 109 — **Rezervor pentru parafina topită**

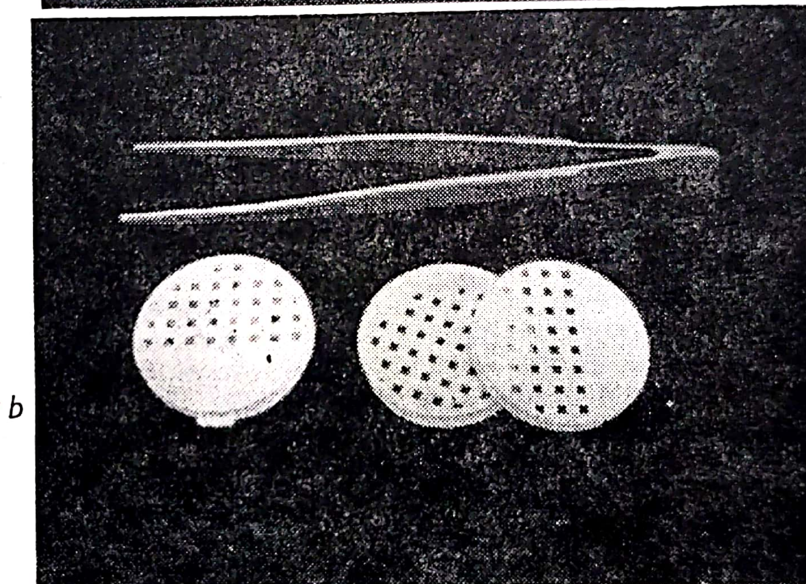
Menţionăm că parafina care se foloseşte în acest scop trebuie amestecată cu ceară de albine (3—5% ceară) pentru a nu fi sfărîmicioasă la secţionare. Este recomandabil ca ceara să fie de cea mai bună calitate, recurgîndu-se eventual, ca şi în cazul parafinei, la fierberea ei în apă; stratul superficial, conţinînd impurităţi, se înlătură.

Amestecarea cu parafină se face la cald, recurgîndu-se apoi la supraîncălzire timp de 15 minute, urmată de filtrare. Cantitatea necesară pentru impregnări se păstrează în vase închise la etuva de 56°C. În principiu, o parafină cu cît se topeşte de mai multe ori cu atît este mai bună pentru secţionare.

d) *Incluzia propriu-zisă* constă în înglobarea piesei impregnate în parafină, care apoi se solidifică prin răcire. Această operaţiune se face în vase metalice, în dispozitive cu rame metalice sau în staniol modelat sub formă de vas. Dacă e vorba de vase (forme) metalice, ele trebuie să aibă înălţimea pereţilor de 2 cm şi suprafaţa variabilă



a



b

Fig. 110 — Capsule pentru fixarea şi incluzia la parafină a pieselor histopatologice

a — metalice; *b* — din material plastic

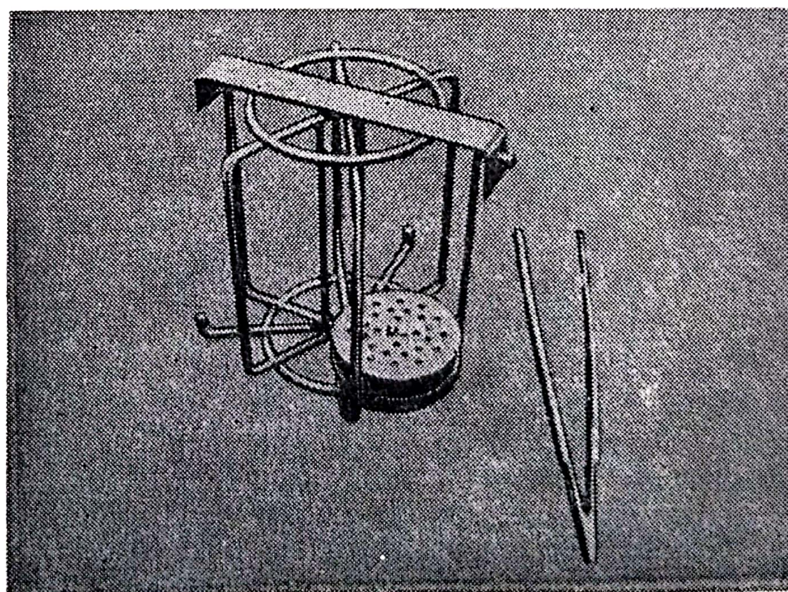


Fig. 111 — Suportul pentru capsule adaptabil la automatul de incluzie

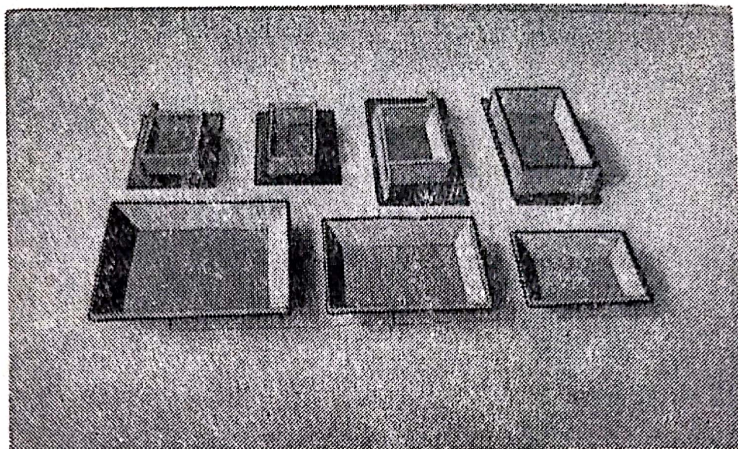


Fig. 112 — Tăvi metalice pentru incluzia la parafină

în funcţie de numărul pieselor ce se includ. Ele se încălzesc la flacără cu ajutorul unei pense, pînă la 70—80°C, după care se toarnă dintr-un vas cu parafină topită la 56°C o cantitate care să depăşească cu circa 5 mm înălţimea pieselor ce urmează a fi incluse (grosimea totală a stratului este de cca 1,5 cm). Apoi, cu o pensă uşor încălzită se pune piesa din ultima baie de parafină, în parafina turnată în formă. Parafina fiind lichidă, permite aranjarea piesei în poziţia dorită pentru secţionare. Se va căuta ca suprafaţa de secţionare a piesei să vină pe fundul vasului, deoarece acolo va începe secţionarea. Pentru identificarea pieselor incluse se vor pune în dreptul fiecăreia din ele, fîşii de hîrtie pe care se scrie cu un creion negru indicativul respectiv. Se solidifică apoi parafina, de preferinţă cît mai repede, utilizîndu-se un vas cu apă rece în care se scufundă forma, pentru ca ea să devină cît mai puţin sfărîmicioasă. După 15—30, minute parafina solidificată se scoate din formă şi se secţionează în blocuri de mărimi variabile, în funcţie de cele ale piesei, restul pa-

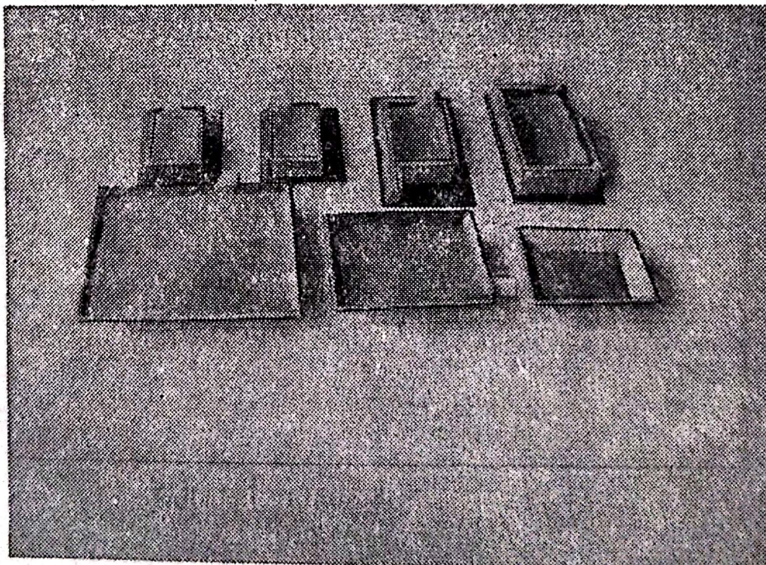


Fig. 113 — Incluzia în tăvi şi forme metalice

rafinei reutilizîndu-se pentru incluzii ulterioare. Blocul cu piesa inclusă trebuie să fie omogen, fără bule de gaze sau impurităţi. În cazul că este lipsit de omogenitate sau orientarea piesei nu este bine făcută, se recurge la reincluzie.

Păstrarea blocurilor de parafină cu piesele incluse se face în cutii de lemn sau carton, la adăpost de praf.

În laboratoarele de histopatologie moderne, se folosesc la ora actuală aparate automatizate, care efectuează conform unor programe prestabilite trecerea pieselor prin diferitele băi de deshidratare şi impregnare la intervalele dorite. În acest fel, se economiseşte mînă de lucru şi se asigură corectitudinea succesiunii acestor lucrări. De asemenea, pentru păstrarea parafinei topite, există rezervoare termoreglabile, din care parafina topită se poate folosi în momentul dorit, prin simpla deschidere a unui robinet.

3 — **Incluzia în celoidină-parafină** este o combinare de metode de incluzie care reuneşte avantajele ambelor procedee şi anume permite cele mai fine secţiuni (pînă la 1 micron) şi ale pieselor compuse din ţesuturi foarte variate (de exemplu globul ocular) sau cu goluri mari (de exemplu traheea). Este mai costisitoare şi durează mai mult.

Principiul constă în incluzia piesei în celoidină, impregnarea blocului de celoidină şi apoi incluzia în parafină. Schematic tehnica constă în următoarele:

— deshidratarea pieselor pînă la alcool absolut
— impregnarea cu alcool absolut + eter
— impregnarea în celoidină 2,4 şi 8%
— incluzia propriu-zisă în celoidină 8% în vapori de cloroform (nu în alcool 70° ca la incluzia în celoidină simplă)
— efectuarea blocurilor de celoidină şi întărirea mai departe 24 de ore în cloroform
— deshidratarea completă a blocului de celoidină timp de 24 de ore într-un amestec uleios deshidratant (cloroform 4 părţi, *oleum origani* 4 părţi, oleu de cedru 4 părţi, alcool absolut 1 parte, fenol cristalizat 1 parte); deshidratarea completă este indicată de clarificarea completă a piesei şi de căderea ei la fund
— impregnarea cu benzol, 2—3 băi
— impregnarea cu parafină 24 de ore la 56—60°C
— incluzia propriu-zisă a blocului de celoidină în parafină, se face între 2 lame de sticlă, pentru a-i forma două suprafeţe plane (una de secţionare şi una pentru fixare pe portobiect).

Blocurile de celoidină-parafină se păstrează ca şi cele de parafină.

Secţionarea

Blocurile conţinînd piesele incluse se secţionează cu ajutorul unor aparate special destinate acestui scop — microtoame, de diferite tipuri şi fabricaţii. Deplasarea portobiectului se face în plan orizontal sau vertical, după tipul microtomului respectiv.

În cazul pieselor incluse la celoidină. Blocurile cu piesele incluse se scot din alcoolul de 70° în care se păstrează înainte de secționare și se lipesc pe un portobiect de lemn, în vederea adaptării la microtomul de celoidină. Lipirea se face cu celoidină. Portobiectul este un bloc de lemn de esență tare, avînd o formă cubică sau paralelipipedică, cu dimensiunile de 3 × 3 × 2 cm, cu două suprafețe mai aspre, pentru a permite o bună aderență.

Pe una din suprafețele aspre se toarnă celoidină 8%. Blocul de celoidină se usucă de alcool și se aplică rapid pe portobiectul de celoidină, apăsînd ușor. Se mai toarnă o cantitate redusă de celoidină deasupra întregului bloc și se acoperă cu un clopot de sticlă, punînd alături un vas cu cloroform pentru a grăbi întărirea celoidinei. Lipirea se realizează după cca 15 minute. Urmează apoi fixarea portobiectului împreună cu blocul, în dispozitivul special al microtomului.

Secționarea propriu-zisă se realizează prin mișcarea în plan orizontal a cuțitului, fixat în poziție oblică. Pentru piesele mici se preferă cuțitele plan concave, iar pentru cele mari și dure, cuțitele biplane.

În tot timpul secționării atît suprafața piesei cît și cea a lamei cuțitului se udă cu alcool de 70°. Secțiunile se ridică de pe lama cuțitului cu o pensulă înmuiată în alcool de 70° și se trec în alcool de aceeași concentrație, fiind gata de colorare.

Grosimea secțiunilor ce se poate obține prin această tehnică este de 10—15 microni.

Secțiunile în acest caz nu sînt seriate. Dacă se dorește păstrarea și examinarea lor în serie este necesar ca ele să fie recoltate în vase diferite sau între bucăți de hîrtie de filtru numerotate.

În cazul pieselor incluse la parafină. Se folosesc microtoame cu cuțit fix, portobiectul cu piese efectuînd mișcări succesive în plan vertical și de înaintare spre cuțit. Este metoda cea mai frecvent folosită.

Blocurile de parafină care conțin piesa trebuie să fie ajustate în prealabil, imprimîndu-le o formă de trunchi de piramidă, în care suprafața de secționare este cea superioară. Trebuie avut de asemenea grijă ca laturile blocului să fie paralele pentru ca secțiunile care rezultă să

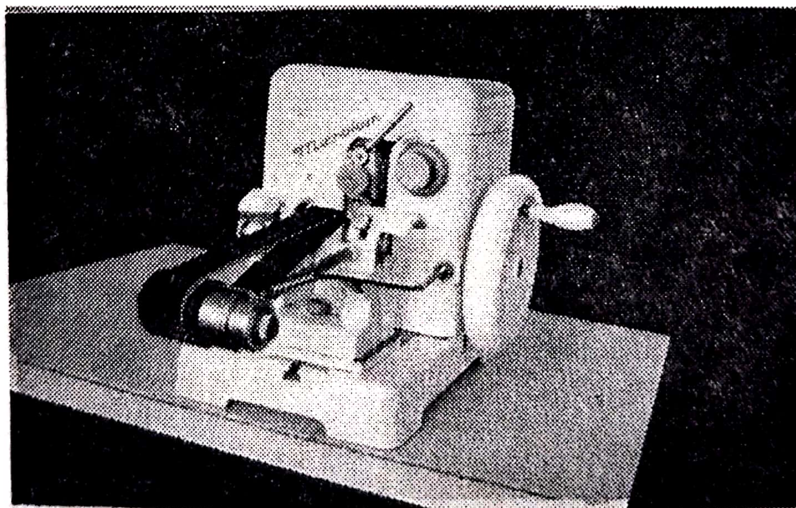


Fig. 114 — Microtom tip IOR de secționare a pieselor histopatologice incluse în parafină

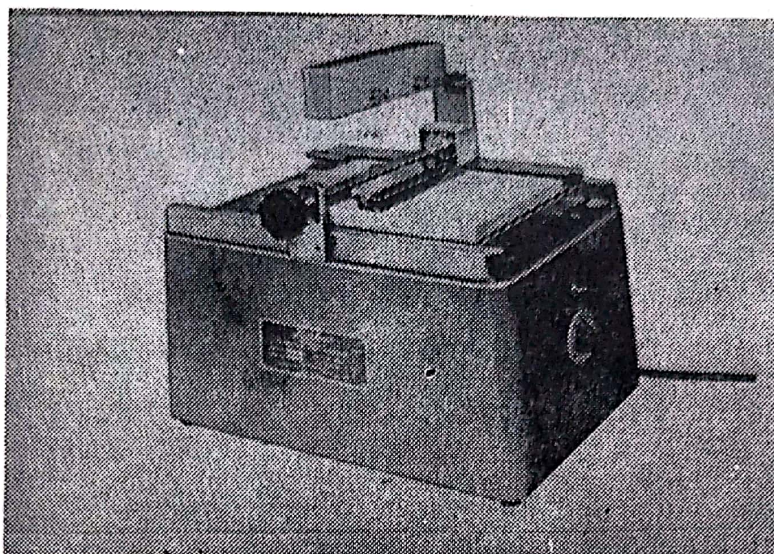


Fig. 115 — Dispozitiv electric pentru ascuțit cuțite de microtom

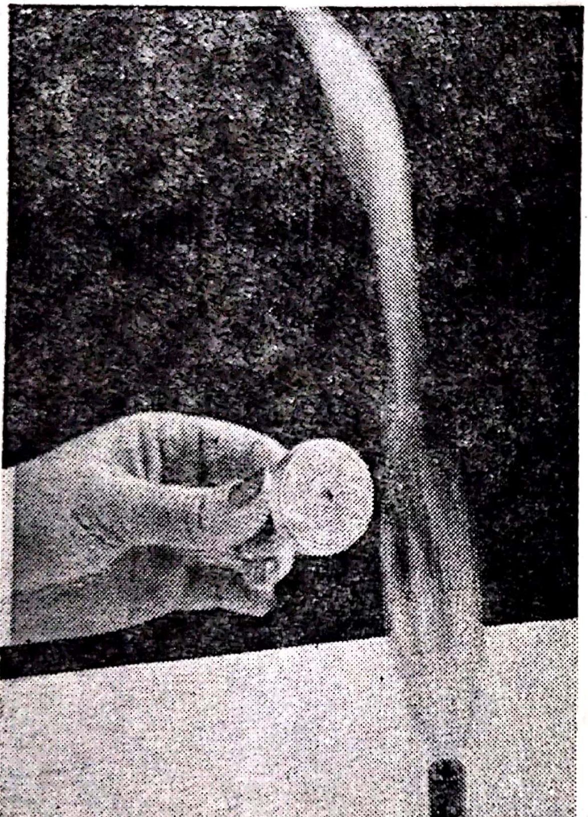
formeze o panglică seriată dreaptă. Este de preferat ca stratul de parafină lateral să fie cît mai redus, însă între marginile superioară și inferioară ale piesei și blocului este nevoie să rămînă un strat de cel puțin 2 mm.

Lipirea blocului pe portobiect se realizează prin încălzirea inițială a acestuia la flacără (se fixează cu un clește sau pensă), după care blocul se compresează ușor pe suprafața de fixare prevăzută cu renuri concentrice pentru o bună aderență. Se poate recurge apoi și la o spatulă încălzită pentru a modela definitiv forma blocului și a realiza o bună aderență a bazei blocului la portpiesă. Imediat se trece totul în apă rece pentru solidificare și deci fixare prin consolidarea parafinei.

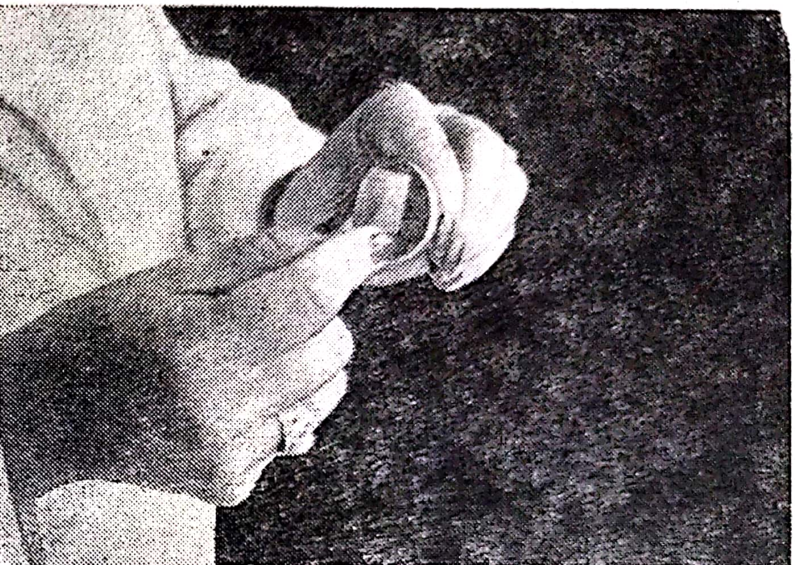
Portpiesa se montează apoi în lăcașul special al microtomului și se orientează de așa manieră ca suprafața dinspre cuțit a blocului să fie paralelă cu cuțitul.

Se potrivește numărul de microni la care se va face secționarea prin rotirea unui disc gradat care reglează pasul de înaintare a portpiesei. Prin rotirea volantului microtomului, după cîteva mișcări, vor apărea secțiuni, la început numai cu parafină, iar apoi conținînd și porțiuni de piesă. Secțiunile apar seriate sub forma unei panglici, rezultate din aderența marginilor fiecărei secțiuni. Dacă nu se obține o panglică, deci marginile secțiunilor nu aderă una la cealaltă, înseamnă că parafina este prea tare (se va recurge la încălzirea atmosferei ambiante). După ce s-au obținut 10—12 secțiuni, se întrerupe secționarea și, cu două ace de disociat, se ridică panglica depunîndu-se pe o hîrtie sau carton negru. Așezînd seriile de panglici în ordine se va ști și ordinea secțiunilor putîndu-se, de asemenea, alege cele dorite pentru prelucrarea ulterioară.

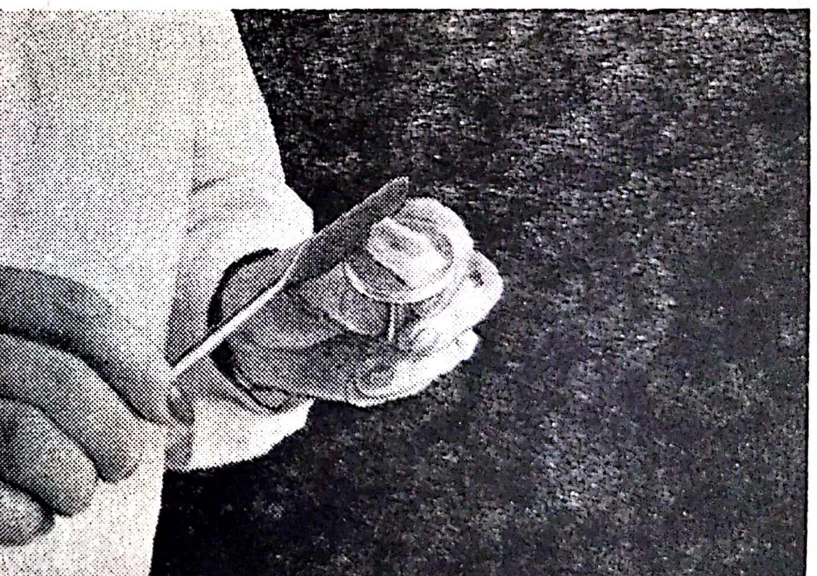
Dacă în timpul secționării parafina din secțiune se desprinde de piesă, înseamnă că în momentul incluziei piesa a fost prea rece și este necesară reincluzia. Cînd piesa se sfărîmă la secționare, locul ei în parafină rămînînd gol, înseamnă că piesa s-a întărit prea mult în cursul manoperelor de incluzie, neavînd aceeași consistență ca și parafina. În acest caz, nu există nici o posibilitate de remediere, piesa fiind pierdută. Dacă în secțiune apar dungi transversale paralele cu tăișul cuțitului, acesta,



a



b



c

Fig. 116 — Lipirea blocului de parafină pe portpiesă

a — încălzirea la flacără a portpiesei; *b* — lipirea propriu-zisă; *c* — ajustarea cu spatula încălzită

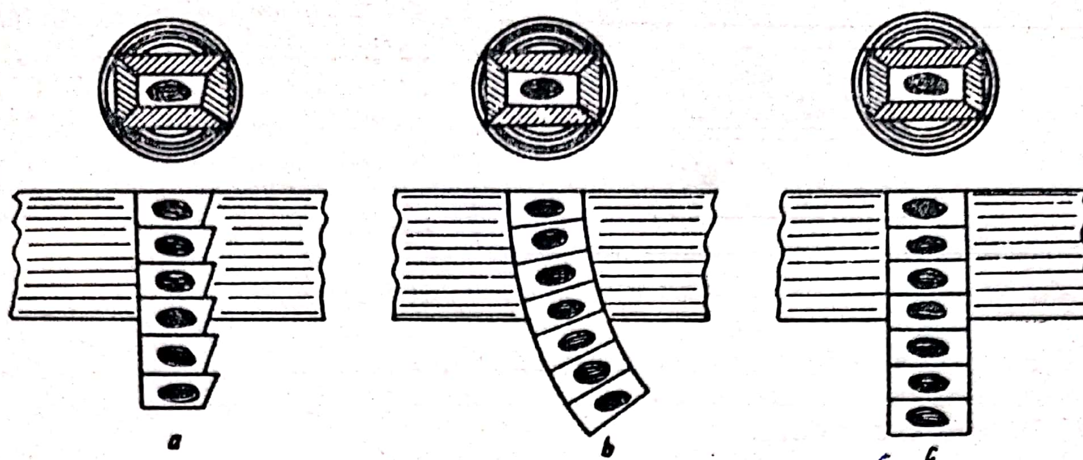


Fig. 117 — Modelarea blocului de parafină în vederea secționării la microtom (a—b) = incorect; c = corect)

blocul sau portpiesa nu sînt bine fixate, rezultînd trepidații care duc la deteriorarea secțiunilor. Dacă apar dungi perpendiculare pe cuțit și ele traversează toată secțiunea (atît piesa cît și parafina), înseamnă că cuțitul nu este bine ascuțit, prezentînd neregularități care fac „gura" lui să nu fie perfectă. Se recurge la deplasarea laterală a cuțitului, pînă se găsește o zonă corespunzătoare, sau la ascuțirea lui.

În acest context sînt oportune cîteva cuvinte despre îngrijirea cuțitelor de microtom. În primul rînd trebuie subliniat că după fiecare întrebuințare este necesar ca ele să fie curățite. Se va evita secționarea unor piese prea dure (incomplet decalcificate), care determină știrbirea cuțitelor. Pentru ascuțire se folosesc pietre speciale (cel puțin de două calități), cuțitele fixîndu-se în monturi speciale care să asigure o înclinare corespunzătoare a cuțitului față de piatră. La ora actuală există dispozitive automate de ascuțire, acționate electric, prin care se realizează o ascuțire uniformă și de bună calitate.

Verificarea tăișului se face prin examinarea acestuia la microscop. Gura cuțitului trebuie să apară ca o linie dreaptă, fără neregularități, dacă cuțitul este bine ascuțit.

Operațiuni ulterioare secționării

Secțiunile obținute, dacă nu sînt prelucrate imediat, pot fi păstrate în condiții diferite în funcție de metoda prin care au fost secționate. Secțiunile la gheață și gelatină se pot păstra în vase închise în apă distilată sau formolată timp de mai multe zile. Cele în celoidină se păstrează indefinit în alcool de 70° în vase bine închise, iar cele în parafină, ca atare, la adăpost de praf și ferite de căldură.

Pentru prelucrare ulterioară, secțiunile trebuie fixate pe lame de microscop (cele de la gheață se pot colora și fără să fie fixate, însă trecerea lor succesivă prin băi este anevoioasă și expune la degradare prin ruperi și disocieri). Lipirea pe lamă se face cu ajutorul albuminei glicerinate. Aceasta este un amestec în părți egale de glicerină cu albuș de ou.

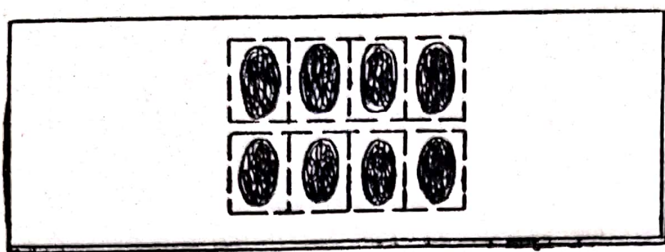


Fig. 118 — Lipirea secţiunilor pe lamă

— Secţiunile la gheaţă se introduc înainte de lipire timp de 10—15 minute în alcool 70° pentru a fi uşor întărite. Apoi se întinde cu pulpa degetului un strat subţire de albumină glicerinată pe lama de microscop şi se culeg 1—2 secţiuni cu ajutorul acelor de disociat. Cu o hîrtie de filtru se perfectează întinderea şi aderenţa secţiunii pe lamă. Prin introducerea lamei în alcool 90° se realizează precipitarea albuminei şi, implicit, lipirea secţiunii.

Pentru a realiza aderenţa secţiunii la lamă se poate recurge şi la încălzirea uşoară a acesteia la flacără, pînă la coagularea albuminei. Cînd se urmăreşte cercetarea grăsimii din ţesuturi, în loc de alcool 90° se foloseşte alcoolul 50°, amestecat cu formol în proporţie de 3,5%.

— Secţiunile în celoidină se trec din alcool 70° pe lamă avînd albumină glicerinată, după care se presează cu o hîrtie de filtru şi se adaugă o picătură de oleu de garoafe, iar după 10—20 minute, cînd piesa este clarificată, lipirea este gata.

— Secţiunile în parafină se lipesc de asemenea cu albumină glicerinată. În acest scop, secţiunile alese ca fiind corespunzătoare ca grosime, uniformitate şi ca zonă din piesa de cercetat, se aşază cu faţa lucioasă spre lamă (faţa lucioasă este aceea care la secţionare era spre tăişul cuţitului). Se adaugă pe lamă cîteva picături de apă distilată în aşa fel ca secţiunea să plutească, dar fără a se stropi suprafaţa secţiunii. Dacă ea prezintă îndoituri, se va întinde cu ajutorul unor ace de disociat, atingîndu-se însă numai marginile de parafină, nu şi secţiunea însăşi. Se încălzeşte apoi lama la o flacără sau pe o platină şofantă, pînă cînd secţiunea se întinde complet, fără însă ca parafina să se topească. Se scurge apa în exces, se orientează secţiunile în poziţie definitivă şi se aşază pe un stativ în poziţie oblică pentru a se scurge întreaga cantitate de apă de pe lamă. Uscarea se efectuează fie la temperatura camerei (6—24 ore), fie la termostat la 37°C cîteva ore, fie la termostatul de

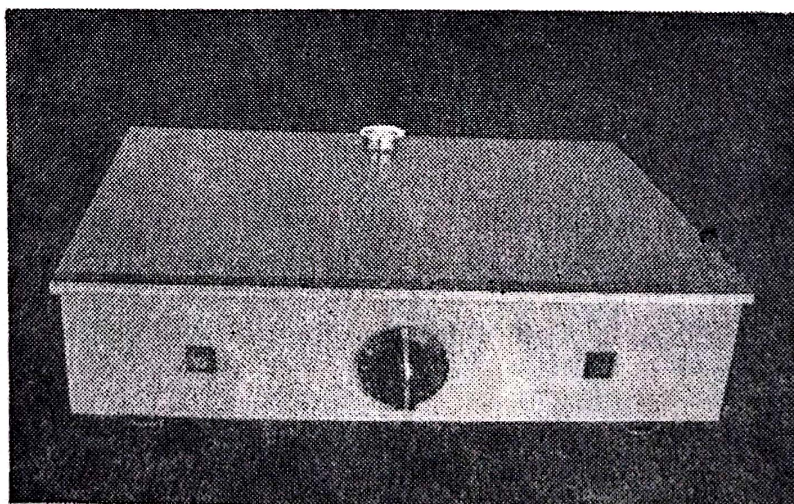


Fig. 119 — Platină şofantă electrică

parafină, timp de 5 minute. Secţiunile care nu sînt lipite vor prezenta la privirea dosului lamei o „oglindă" în dreptul secţiunii.

Secţiunile din anumite ţesuturi (muşchi, ţesuturi elastice) precum şi cele fixate în acid osmic şi bicromaţi se lipesc cu mare greutate şi pentru acest motiv se poate recurge la aşa-numita celoidinare. În acest scop, secţiunile sînt culese pe lame foarte curate, după care se scurge excesul de apă şi se sugativează atent. Se aşază apoi peste secţiuni o bucăţică de hîrtie de filtru uscată şi se picură peste ea alcool absolut, repetîndu-se operaţiunea după 1—2 minute. Lamele vor fi trecute în soluţie de celoidină 1% unde se ţin 5 minute şi în continuare, în alcool 70° timp de 10 minute, astfel încît pelicula de celoidină să se întărească. Deparafinarea şi colorarea ulterioară nu sînt împiedicate de stratul de celoidină. Metoda este indicată mai ales pentru colorarea PAS, colorarea Gram pe secţiuni, cînd folosirea albuminei este contraindicată.

Colorarea

Pentru a se putea diferenţia diversele ţesuturi şi celule între ele în cursul examinării la microscop, este necesară colorarea lor. Chiar ţesuturile pigmentate (piele, iris, coroidă), pentru a permite observarea unor detalii de structură, necesită colorări suplimentare. Materia colorantă este fixată în mod variabil de diferite tipuri de ţesuturi, conform afinităţilor lor tinctoriale. Prin compoziţia chimică foarte complexă a ţesuturilor şi prin caracterul diferit al coloranţilor, se produce o repartiţie diferenţiată a colorantului şi se obţin nuanţe diferite, chiar dacă se foloseşte un singur colorant. Coloranţii acizi produc de obicei coloraţia prin imbibiţie, în timp ce cei bazici prin precipitare — aceasta din urmă fiind un fenomen de suprafaţă propriu numai anumitor ţesuturi (de exemplu coloraţia nucleară a granulaţiilor bazofile, coloraţia mucusului, a cartilajului). Dar pe lîngă aceste procese fizice se produc şi reacţii chimice care stau la baza fixării coloranţilor în ţesuturi. Uneori însă, substanţa colorantă nu se prinde de elementele structurale ale ţesuturilor decît dacă se intervine cu substanţe care facilitează acest lucru. Aceste substanţe sînt cunoscute sub numele de mordanţi, iar operaţiunea — mordansare. Între ţesut, mordant şi colorant se produce o combinaţie stabilă. Dintre mordanţi pot fi menţionaţi — oxidanţii metalici (acidul osmic, cromic, azotic, fosfomolibdenic, fosfotungstic), oxidanţi metaloizi (iodul, bromul), oxidanţi organici (acidul picric, fenolul), alauni (feric, potasic) unele baze (soda caustică, carbonatul de potasiu, carbonatul amoniacal). După cum se vede, o parte din aceste substanţe sînt folosite şi ca fixatori, ceea ce face ca, prin fixare chiar, să se facă o mordansare.

În acest context mai trebuie menţionat un fenomen întîlnit în procesul de coloraţie şi anume — metacromazia. Aceasta este proprietatea pe care o au unele substanţe de a colora în mod diferit faţă de culoarea lor aparentă. Pe baza acestei însuşiri, cu unul şi acelaşi colorant se pot colora în mod diferit elemente tisulare sau celulare diferite. Dintre coloranţii metacromatici pot fi amintiţi — tionina, albastru de toluidină, azurul de metilen, violetul de metil etc.

După însuşirile lor chimice, coloranţii pot fi: acizi, bazici şi neutri. De obicei substanţele colorante sînt săruri în care baza sau acidul determină culoarea. În cazul coloranţilor bazici, baza este colorată, iar acidul este incolor (de exemplu albastrul de metilen este o sare formată din tetrametiltionină colorată şi acid clorhidric incolor). În cazul coloranţilor acizi, baza este incoloră iar acidul colorat (de exemplu eozina este compusă din acid carmic colorat şi sodiu incolor). În coloranţii neutri, atît baza cît şi acidul sînt coloraţi. Există şi coloranţi care nu au nici baze nici acizi în structură şi ca urmare, nu pot forma săruri (coloranţi indiferenţi). Ei sînt solubili în alcool, oleuri grase, şi colorează de obicei materiile grase (de exemplu Sudanul — un colorant natural).

După modul de obţinere, coloranţii mai pot fi: naturali (carminul, hematoxilina, orceina, safranul etc.) şi artificiali (verdele de metil, albastrul de toluidină, eozina, fucsina, verdele luminos etc.).

După afinităţile tinctoriale coloranţii pot fi nucleari (de obicei bazici — carminul, hematoxilina, verdele de metil, albastrul de toluidină, albastrul de metilen, tionina), coloranţi citoplasmatici (de obicei acizi — orceina, safranul, eozina, fucsina, verdele luminos) şi coloranţi indiferenţi (Sudanul).

Colorarea se poate face în mod diferit după ţesutul în cauză şi după colorant. În principiu, aceasta poate fi vitală şi pe elemente fixate. Cea mai larg folosită este coloraţia pe elemente fixate. După modul cum se acţionează cu colorantul, în practică sînt folosite mai multe procedee:

— coloraţia directă (prin acţiunea directă a colorantului asupra ţesutului);

— coloraţia indirectă (care necesită folosirea unor mordanţi);

— coloraţia simplă (nucleară sau citoplasmatică, utilizîndu-se un singur colorant);

— coloraţia complexă — prin acţiunea mai multor coloranţi: aceasta poate fi simultană sau succesivă, după cum se acţionează cu complexul colorant;

— coloraţia progresivă, care foloseşte coloranţi slabi, diluaţi, care acţionează timp îndelungat, colorînd ţesuturile treptat;

— coloraţia regresivă — în care se face supracolorarea ţesuturilor, urmată de îndepărtarea excesului de colorant, cu ajutorul unei substanţe diferenţiatoare;

— coloraţia panoptică, proprie coloranţilor neutri şi metacromatici, prin care se poate pune în evidenţă un număr mare de elemente, cu tonuri variate.

Coloraţia pe elemente fixate diferă după metoda de obţinere a secţiunilor.

În cazul pieselor secţionate prin congelaţie, secţiunile pot fi colorate imediat sau după o prealabilă fixare pe lamă. Colorarea secţiunilor nefixate se face prin trecerea lor prin băi succesive de coloranţi, puşi în sticle de ceasornic. Manipularea pieselor se face cu ace de disociat, avîndu-se grija de a nu le rupe, îndoi sau dezintegra. Spre exemplificare sînt date cîteva din cele mai frecvente metode folosite.

Coloraţia simplă cu eozină

Secţiunile se trec rapid prin colorant (cîteva secunde) după care se spală într-o baie de apă distilată, se culeg pe o lamă de microscop, se montează şi se examinează.

Coloraţia simplă cu hematoxilină

Secţiunile se trec rapid în soluţia de colorant, după care urmează o baie de apă de robinet (10 minute) în care culoarea secţiunilor virează spre albastru, apoi o baie scurtă de apă distilată, montare şi examinare.

Colorarea bicromică cu hematoxilină-eozină

— colorare cu hematoxilină — rapid, cîteva secunde, pînă la obţinerea culorii violet a secţiunii
— baie de apă de robinet — 10 minute
— apă distilată — spălare
— colorarea cu eozină 1% — cîteva secunde
— spălare cu apă distilată
— montare, examinare.

Dacă secţiunile sînt lipite pe lamă, se folosesc vase speciale — pahare Borel prin care lamele se trec succesiv — conform metodei de colorare preconizată, după aceleaşi tehnici, doar că timpul de ţinere în baia de colorant se prelungeşte la 1—2 minute în cazul hematoxilinei.

În cazul pieselor secţionate la parafină este necesară mai întîi deparafinarea lor pentru ca coloranţii să poată fi fixaţi.

Deparafinarea se obţine cu ajutorul solvenţilor parafinei (benzenul, toluenul, xilolul), secţiunile trecîndu-se în stare lipită pe lamă, prin 2—3 băi cu asemenea solvenţi, repartizaţi fie în pahare Borel, fie în băi speciale cu renuri multiple (băi Laveran), cînd e vorba de mai multe lame care se prelucrează simultan.

Deparafinarea durează 10—15 minute (cîte 5 minute în fiecare baie) şi este urmată de hidratarea secţiunilor.

Hidratarea constă în trecerea lamelor cu secţiuni succesiv prin băi de alcool de concentraţii descrescînde: alcool absolut — 1 baie, alcool

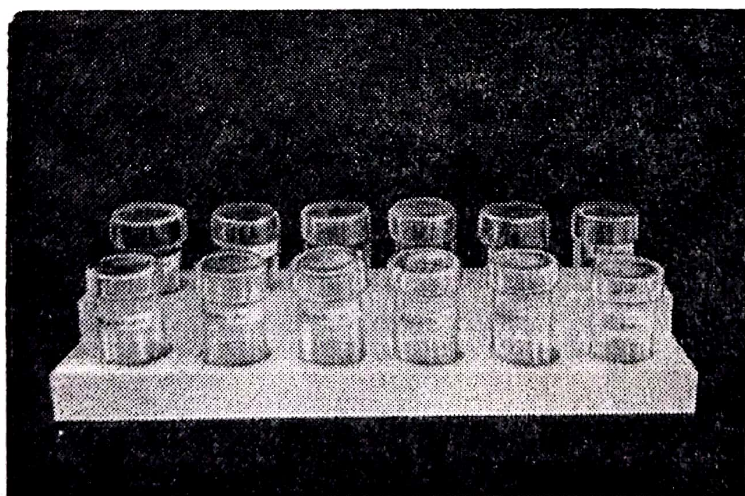


Fig. 120 — Baterie de colorare a secţiunilor histopatologice

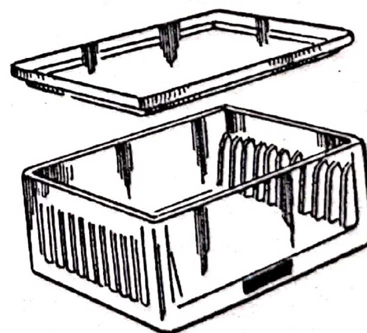


Fig. 121 — Baie Laveran pentru colorare

96° I, II, III (3 băi) și alcool 70° — 1 baie, după care urmează o baie de apă distilată și, în fine, băile de coloranți.

Colorarea constă în introducerea pieselor într-una sau mai multe băi de coloranți și menținerea lor un timp diferit, variabil după puterea de difuziune a colorantului în țesutul de cercetat. Colorația poate fi precedată de băi de mordanți. De asemenea ea este întreruptă sau urmată de diverse băi de diferențiere, apă de spălare etc. Pentru exemplificare sînt redate cîteva metode dintre cele mai uzuale.

Colorarea simplă cu eozină

— deparafinare
— hidratare — prin băi de alcool de concentrație descrescîndă (alcool absolut, alcool 96° I, II, III, alcool 70°) cîte 1 minut în fiecare
— spălare cu apă distilată
— colorare cu soluție apoasă de eozină 1% timp de 1—2 minute
— spălare cu apă distilată
— deshidratare — prin băi de alcool de concentrație crescîndă (alcool 70°, alcool 96° I, II, alcool absolut) cîte 1 minut în fiecare
— clarificare cu xilol
— montare în balsam de Canada.

Citoplasma și țesutul conjunctiv apar colorate în roșu.

Colorarea simplă cu hematoxilină

— deparafinare
— hidratare
— colorare cu soluție de hematoxilină Mayer, 4—6 minute
— apă de robinet timp de 10 minute (nucleii se colorează în albastru-închis, citoplasma și celelalte țesuturi apar cenușii)
— spălare cu apă distilată
— deshidratare
— clarificare cu xilol
— montare în balsam de Canada.

Asemănătoare este și colorația cu hematoxilina ferică (Heidenhein), în care mordansarea se face cu alaun de fier în soluție separată (durează însă mai mult).

Colorarea bicromică cu hematoxilină-eozină

Este o colorație combinată succesivă.

— deparafinare
— hidratare
— colorare nucleară timp de 4—6 minute cu hematoxilină Mayer
— spălare cu apă de robinet timp de 1 minut
— diferențierea cu apă acidulată (0,5% HCl) timp de 3 secunde
— spălare cu apă de canal 10 minute
— spălare cu apă distilată
— colorarea citoplasmatică și a țesutului conjunctiv timp de 1—2 minute cu soluție apoasă de eozină 1%
— spălare cu apă distilată
— deshidratare (alcool 70°, alcool 96° I, II, alcool absolut)
— clarificare cu xilol
— montare în balsam de Canada.

Nucleii vor apărea colorați în violet intens, citoplasma în roșu, țesutul conjunctiv în roșu intens, globulele roșii în galben-roșiatic.

Colorația tricromică — hematoxilină-eozină-verde luminos
— deparafinare
— hidratare
— spălare cu apă distilată
— hematoxilină, 6—8 minute
— apă de robinet, la care se adaugă cîteva picături de acid acetic glacial 10 minute
— colorare cu eozină (sol. apoasă 1%) sau eritrozină oranj, timp de 5—8 minute
— apă distilată — spălare
— acid fosfomolibdenic timp de 5—8 minute
— colorare cu sol. apoasă verde luminos 1%, timp de 1 min.
— apă distilată — spălare 2—3 minute
— alcool 70° — pînă se elimină excesul de colorant
— alcool 96° I, II, alcool absolut, cîte 1 minut
— xilol
— montare

După aceleași principii se poate efectua și colorarea tricromică hematoxilină-eozină-albastru de metil.

Colorația cu Sudan III
— colorare cu soluție Sudan 0,1% — 24 de ore
— spălare cu apă distilată
— colorare cu hematoxilină, 1—2 minute
— apă de robinet — 10 minute
— spălare cu apă distilată
— montare în glicerină, examinare.

Nucleii apar colorați în violet, substanța grasă în galben portocaliu.

Colorația Gram-dublu se folosește pentru punerea în evidență a germenilor în secțiuni. Constă în următoarele:
— colorare cu violet de gențiana 1 minut
— tratare cu soluție Lugol 1 minut
— diferențiere cu alcool-acetonă
— recolorare cu fucsină diluată 1/10 timp de 1 minut
— spălare cu apă distilată
— deshidratare, montare

Colorația Ziehl-Neelsen se folosește pentru punerea în evidență a acido-rezistenților în țesuturi:
— colorare cu fucsină Ziehl — 24 de ore
— spălare cu apă
— diferențiere cu alcool-acid (100 ml alcool de 70° + 3 ml HCl concentrat) pînă cînd nu se mai scurge alcool colorat din secțiune
— spălare în apă de robinet curgător timp de 10 minute
— recolorare cu albastru de metilen 0,1% timp de 15 minute
— spălare cu apă
— deshidratare, montare

Colorația Romanowsky-Giemsa se folosește pentru punerea în evidență a corpusculilor elementari în secțiunile tisulare. Constă în următoarele:

— secțiunile deparafinate se țin 10 minute în apă distilată, după care se introduc într-o baie Laveran cu soluție colorantă Giemsa, diluată

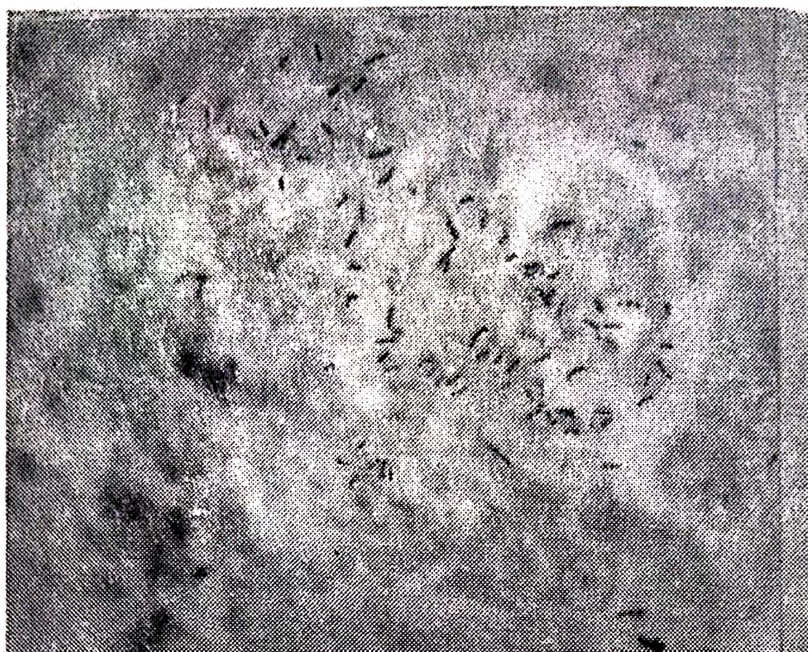


Fig. 122 — Bacili ai tuberculozei în secţiuni de ţesuturi

ex tempore în proporţie de 1 ml soluţie de bază la 15 ml, şi se menţin 24—48 de ore, la întuneric; se recomandă ca la 12 ore soluţia colorantă să fie schimbată;

— spălare cu apă distilată — 15 minute
— deshidratare în alcool absolut
— diferenţierea se face picurînd atent pe suprafaţa secţiunii o soluţie preparată din esenţă de cuişoare (10 ml) în alcool absolut (90 ml); în momentul în care colorarea secţiunii, iniţial albastră, începe să vireze spre roz, se spală abundent cu alcool absolut;
— clarificare cu xilol sau toluol
— montare în balsam de Canada.

Dacă se doreşte o colorare mai rapidă se poate recurge la introducerea băii Laveran cu colorant la 45°C timp de 12 ore, perioadă în care colorantul se împrospătează de 2—3 ori.

Corpusculii elementari vor apărea coloraţi în roz-aprins sau purpuriu pe un fond roz-mov iar nucleii în violet deschis.

Coloraţia Nicolau-Kopciovska serveşte evidenţierii corpusculilor elementari şi face uz de două soluţii colorante:

— Soluţia A:

— fucsină acidă	1,5 g
— alcool metilic	33,0 ml
— glicerină	5,0 ml
— sol. de acid oxalic 6%	2,0 ml
— apă distilată	60,0 ml

— Soluţia B:

— albastru de metil	1,5 g
— alcool metilic	33,0 ml
— glicerină	5,0 ml
— sol. de acid oxalic 6%	2,0 ml
— apă distilată	60,0 ml

Colorația se realizează după cum urmează:
— secțiunea deparafinată și hidratată se acoperă cu soluția A timp de 1—2 ore
— se varsă colorantul și fără a se spăla, se acoperă cu soluția B, timp de 10—15 minute
— se spală abundent cu alcool absolut
— clarificare cu xilol sau toluol
— montare în balsam de Canada.

Corpusculii elementari apar colorați în nuanțe variind de la albastru-deschis la violet, pe un fond albastru-deschis. Corpusculii elementari degenerați, surprinși în faza incluziogenetică, vor apărea în nuanțe roșietice. Incluziile celulare se colorează în roșu-închis.

Montarea

După colorare secțiunile pentru a putea fi examinate la microscop, trebuie montate. Montarea se poate face în:
— medii apoase
— medii anhidre

Montarea în medii apoase se face punînd deasupra secțiunii colorate scoase din apă, o picătură de glicerină iar apoi o lamelă perfect curată. Se presează ușor cu un ac de disociat, pentru eliminarea bulelor de gaze. Cantitatea de glicerină nu trebuie să fie prea mare, pentru a nu depăși, prin compresarea lamelei, marginile acesteia. Preparatele astfel confecționate se pun în poziție orizontală, iar păstrarea se face pe suporturi speciale în aceeași poziție. Metoda se folosește în special pentru preparatele provizorii, întrucît nu asigură o conservabilitate de durată a piesei. Dacă preparatele trebuie păstrate totuși cîteva zile, se poate recurge la chituirea lor (fixarea lamelei de lamă și închiderea spațiului în care este inclusă secțiunea). Chituirea se poate face în mai multe feluri:
— cu parafină sau ceară: acestea se topesc în vase mici și se aplică cu ajutorul unei spatule pe limitele dintre lamă și lamelă;
— cu chit special destinat acestui scop și care se prepară din:

— lanolină anhidră	20,0 g
— colofoniu	80,0 g

care se amestecă la cald și se păstrează în cutii de metal sau carton. Chituirea propriu-zisă în acest caz se realizează cu ajutorul unei vergele de metal de 1,5—2 mm diametru îndoită în unghi drept la una din extremități. Cu vergeaua încălzită la flacără se ia o cantitate redusă de chit și se aplică în mai multe puncte pentru fixarea lamelei. Ulterior prin aplicarea ei de-a lungul lamelei, se realizează întinderea uniformă a chitului. Prin răcire, spațiul dintre lamă și lamelă se închide complet.

Procedeul se aplică larg și pentru preparatele de insecte, viermi etc.

Montarea în medii anhidre servește la pregătirea preparatelor care urmează a fi păstrate vreme îndelungată. Aceste medii anhidre sînt reprezentate de diverse rășini cu indice de refracție mare, solubilizate în toluol sau xilen și care, prin evaporare, se întăresc lipind lamela de pre-

parat. Cea mai răspîndită metodă este montarea în balsam de Canada, dar se pot folosi şi alte răşini de conifere sau răşini sintetice cu calităţi optice asemănătoare. Aceste răşini nefiind miscibile cu apa, o condiţie esenţială este ca secţiunile să fie foarte bine deshidratate înainte de montare.

Deshidratarea care urmează colorării se face în băi succesive de alcool cu concentraţii crescînde. Din ultima baie de colorant secţiunile libere sau lipite pe lamă se trec într-o baie de spălare a excesului de colorant, după care urmează băile de alcool pînă la alcool absolut. Se fac de obicei cîte două băi de fiecare concentraţie, în care secţiunile stau cîte 2—3 minute. O şedere mai îndelungată se soldează cu decolorarea treptată a secţiunilor.

Clarificarea urmează deshidratării şi se face cu scopul de a îndepărta alcoolul, precum şi ultimele resturi de apă.

După băile de alcool, secţiunile se introduc în 1—2 băi de clarificant, care poate fi toluolul fenicat (trei părţi toluol şi o parte fenol), alcoolul amilic sau benzolul. Cel mai bun este alcoolul amilic. Apoi se fac 1—2 băi de toluol sau xilol pur.

Montarea propriu-zisă. În cazul secţiunilor libere (obţinute la gheaţă sau celoidină) ele se pun pe lamă şi se întind. Cele lipite pe lamă se şterg de toluol şi, înainte ca ele să se usuce, se acoperă cu o picătură de balsam, peste care se pune o lamelă. Se presează lamela cu vîrful unui ac de disociere, eliminîndu-se eventualele bule de aer. Mărimea picăturii de balsam trebuie să fie astfel aleasă încît prin întinderea ei să nu treacă peste marginile lamelei. Trebuie subliniat că pe parcursul tuturor timpilor de prelucrare (deparafinare, hidratare, colorare, deshidratare) secţiunile nu trebuie să se usuce. În primele 24 de ore lama se păstrează în poziţie orizontală, dar apoi se poate aşeza în orice poziţie, balsamul fiind consolidat şi deci lamela fixată.

Impregnările metalice

Constituie o altă modalitate de a diferenţia elementele diferitelor ţesuturi. Se bazează pe proprietatea pe care o au unele elemente de a reţine sărurile metalice şi, pe de altă parte, pe afinitatea specifică pe care o au aceste săruri pentru unele structuri (celule sau fibre). Reducerea sărurilor respective la nivelul ţesuturilor face ca ele să fie depuse sub forma unor precipitate fine. Astfel de săruri sînt azotatul de argint, protargolul, clorura de aur, clorura de platină, azotatul de cobalt. Reducerea se face prin acţiunea însăşi a ţesutului pregătit prin fixare, prin intermediul unor agenţi fizici (lumina, căldura) sau agenţi chimici (formol, hidrochinonă, acidul formic).

Metodele de impregnare se folosesc pentru punerea în evidenţă a celor mai fine structuri celulare, precum şi a elementelor sistemului nervos. Printre metodele de impregnare cele care folosesc azotatul de argint par a fi cele mai răspîndite (metoda Bielschowsky, Kolatschev).

În aplicarea impregnărilor metalice, pentru reuşita lor, sînt necesare cîteva condiţii:

— să se folosească numai reactivi chimici puri

— să se lucreze cu apă bidistilată neutră
— sticlăria să fie de cea mai bună calitate și să fie folosită numai în acest scop
— să se folosească cantități suficiente de soluții (cel puțin de 20 de ori volumul pieselor)
— în cursul impregnării, preparatele să fie ținute la adăpost de lumină (în vase colorate în brun)
— să se evite folosirea instrumentelor metalice (ele vor fi din sticlă sau material plastic).

Impregnările metalice se pot face pe țesuturi membraniforme (mezenter sau alte endotelii), pe secțiuni sau în piese masive (blocuri).

Impregnarea țesuturilor membraniforme
— fixarea țesutului pe o suprafață întinsă (cu ace de arici)
— spălare cu apă distilată
— impregnarea prin scufundare într-o soluție de NO_3Ag 1/200 timp de 1—2 ore
— reducerea prin expunere la lumina solară, pînă ce țesutul devine de culoare brună (2—5 minute)
— spălare cu apă distilată
— întărirea țesutului cu alcool 90°
— ajustarea țesutului la dimensiunile corespunzătoare în vederea montării
— deshidratare
— montare în balsam sub lamelă.

Prin aceeastă tehnică, limitele celulare vor apărea foarte bine evidențiate, de culoare brună-închisă.

Impregnarea secțiunilor se poate realiza prin metoda Bielschowsky, care constă în următoarele:
— fixare timp de 3—6 săptămîni în formol 10%
— spălare cu apă de robinet timp de 24 ore
— spălare cu apă distilată — 24 de ore
— secționarea prin congelare — la 5—10 microni
— mordansarea timp de 24 de ore cu $AgNO_3$ 2% la întuneric
— spălare cu apă distilată
— impregnare cu lichid Bielschowsky timp de 15—20 minute pînă secțiunile devin brun-închise (azotat de argint amoniacal preparat astfel: se adaugă la 10 ml $AgNO_3$ 10% 5 picături de NaOH 40%; precipitatul brun-verzui care rezultă, se dizolvă cu amoniac adăugat picătură cu picătură, fără a depăși limita solubilizării, după care se completează pînă la 20 ml cu apă distilată)
— spălare cu apă distilată
— reducere cu formol 1/9, timp de 10 minute
— spălare, deshidratare, montare.

În acest caz, fibrele nervoase (axonii) apar de culoare brună-închisă, pe un fond gălbui.

Se poate folosi în același scop și colorația Gömöri.

Colorația Gömöri (impregnația argentică). Secțiunile deparafinate și hidratate, se trec succesiv prin următoarele soluții:
— permanganat de potasiu 1% — 2 minute
— spălare cu apă timp de 5 minute
— metabisulfit de potasiu 1—3% timp de 1 minut

— spălare în apă — 5—10 minute
— sulfat dublu de fier și amoniu 2% (se prepară extemporaneu), timp de 1 minut
— spălare în apă 3—5 minute
— spălare în 2 băi de apă distilată cîte 2 minute
— impregnare în soluție de azotat de argint amoniacal, timp de 1 minut sau mai mult (prin tatonare)
— spălare rapidă în apă distilată (5—10 secunde)
— reducere în formol neutru 1/10 în apă distilată, timp de 5 minute
— spălare cu apă, 5 minute
— soluție de clorură de aur 0,1—0,2% timp de 10 minute
— spălare în apă distilată
— reducere în metabisulfit de potasiu 1—3% timp de 1 minut
— tiosulfat de sodiu 1% — 1 minut
— spălare în apă curentă 15—20 minute
— deshidratare în băi de alcool de concentrații crescînde (70°, 80°, 96°, alcool absolut)
— clarificarea în xilol
— montare în balsam de Canada.

Rezultat: fibrele colagene se colorează în roșu-purpuriu, fibrele de reticulină în negru intens, nucleii în negru iar citoplasma în galben cenușiu.

Reușita colorației depinde în foarte mare măsură de prepararea soluției argento-amoniacale (amoniacul în exces duce la o insuficientă impregnare, în timp ce reducerea cantității de amoniac se soldează cu supraimpregnări grosiere), precum și de timpul de spălare ce succede impregnarea (o spălare insuficientă determină formarea de precipitate, iar o spălare prelungită are ca efect o impregnare inegală a fibrelor de reticulină).

Impregnarea blocurilor se poate face folosind metoda Kolatschev:

— fixarea piesei în amestecul:

— acid cromic 1%	7,0 ml
— bicromat de potasiu 3%	7,0 ml
— acid osmic 2%	4,0 ml

timp de 24 ore la rece
— spălare rapidă cu apă distilată
— impregnare cu acid osmic 1% timp de 3—9 zile la 35 °C
— spălare cu apă curentă — timp de 24 ore
— deshidratare
— incluzia la parafină
— secționare
— deparafinare, deshidratare, montare

Metoda este folosită pentru lucrări de citologie fină, prin ea punîndu-se în evidență aparatul Golgi (acesta apare de culoare brună).

Metode de diagnostic histopatologic rapid

În unele cazuri se impune precizarea diagnosticului într-un timp cît mai scurt, pentru a putea fi instituite măsurile corespunzătoare atît în privința individului în cauză, cît și a contacților. Astfel, de exemplu,

în caz de turbare este necesar să se cunoască în cît mai scurt timp dacă animalul în cauză a fost sau nu turbat. În medicina umană şi mai rar în medicina veterinară, în caz de operaţii, este necesar să se cunoască natura ţesuturilor cu aspect tumoral, care adesea apar ca surprize, ce incumbă cu totul altă conduită. Pentru a avea deci un rezultat cît mai rapid s-au căutat metode care să dureze cîteva ore cel mult şi, bineînţeles, să fie cît mai simple şi expeditive.

În cazul turbării, spre exemplu s-a recurs la punerea în evidenţă a corpusculilor Babeş—Negri în amprente practicate din sistemul nervos (cornul lui Ammon, hipocamp, cerebel). Aceste amprente se colorează apoi după diferite metode:

Metoda Sellers foloseşte o soluţie compusă din două părţi:

— soluţia A: albastru de metilen 2% în metanol

— soluţia B: fucsină bazică 4% în metanol. Ele se amestecă ex tempore în proporţie de 15 ml soluţie A la 2—4 ml soluţie B, la care se adaugă 25 ml metanol. De menţionat că nu este necesar ca amprentele să se fixeze înainte de colorare, ele pretîndu-se la aceasta chiar în stare încă umedă. Colorantul este lăsat să acţioneze 4—5 secunde. Se spală cu apă de robinet şi se usucă. Citoplasma neuronilor apare albăstruie, nucleii şi nucleolii — albaştri, hematiile — roşii-cărămizii, bacteriile — albastre-închis. Corpusculii Babeş—Negri apar roşii-purpurii, uşor de identificat.

Se poate recurge şi la secţiuni obţinute prin fixare rapidă. În acest scop se folosesc fixatorii anhidri (alcoolul, acetona, amestecul de acetonă şi alcool, amestecul de acetonă şi cloroform) sau fixatorii obişnuiţi (formolul) încălziţi pînă aproape de punctul de fierbere. Pentru creier, cea mai indicată este acetona. Piese nu mai groase de 4 mm recoltate din segmentele de predilecţie se pun în 50—100 ml acetonă, preferabil încălzită în prealabil la 50°C în etuvă. În 5—10 minute piesele se întăresc uşor, şi se efectuează ajustarea lor pînă la grosimea de 2—3 mm. După alte 10—15 minute ele devin albe-cretacee, dense, dar nesfărîmicioase.

După fixare, piesele se trec într-o baie de parafină unde se ţin 30—60 minute, în funcţie de grosimea piesei. Se consideră că piesa este pătrunsă de parafină cînd nu se mai degajă bule de acetonă la încălzirea parafinei cu o spatulă încălzită.

După incluzie piesele se secţionează şi se întind pe lame, se deparafinează, se colorează prin una din metodele elective (Mans, Lenz, Carpano, Gallego, Sellers etc.), se montează şi se examinează.

Spre exemplificare sînt redate cîteva procedee mai mult folosite:

— fixarea cu acetonă la 56° timp de 90 minute

— trecerea în baia de parafină încălzită

— incluzia în parafină

— secţionare

— colorarea cu eozină soluţie apoasă 1% timp de 1 minut

— spălare în apă distilată

— colorare cu albastru de metilen Löffler timp de 1 minut

— deshidratare

— montare.

Metoda Lenz

— fixare în acetonă iodată, timp de 1 oră la 56°

— alcool 96° — 30 minute
— xilol — 30 minute
— baie de parafină încălzită
— incluzia în parafină
— colorare cu eozină 1 minut
— spălare cu apă
— colorare cu albastru de metilen Löffler — 1 minut
— spălare
— diferenţiere cu alcool alcalin (alcool alcalinizat cu NaOH)
— diferenţiere cu alcool acid (alcool acidulat cu acid acetic)
— spălare în alcool absolut
— xilol
— montare.

Secţiunile la gheaţă, pe ţesuturi fixate, pot fi prelucrate rapid după următoarea tehnică:

— se recoltează porţiuni foarte mici (de 3/3 mm) din ţesutul de cercetat
— se fixează timp de 5 minute în soluţie de formol 1/4 încălzită pînă aproape de fierbere (70—80°), respectiv pînă la o uşoară degajare de gaz
— congelare şi secţionare la microtomul de gheaţă, la 10—15 microni
— culegerea secţiunilor în apă distilată
— întinderea secţiunilor (alcool de 70°, urmat de apă distilată)
— lipire pe lamă
— colorare
— montare.

Colorarea acestor secţiuni se poate face prin următoarele metode:

Coloraţia cu albastru de toluidină

— alcool 90° 1—2 secunde
— alcool absolut 1—2 secunde
— xilol, cca 2 secunde, timp în care lamele se agită pentru clarificare
— alcool absolut 1—2 secunde
— alcool 90° 1—2 secunde
— se aşază apoi lamele pe stativ şi se acoperă cu soluţie 1% albastru de toluidină, lăsînd în contact 30—60 secunde
— clătire rapidă în apă, sugativare
— lamele se umezesc cu alcool 90° şi se sugativează bine
— se umezesc apoi cu alcool absolut şi se sugativează
— se trec în xilol pentru clarificare şi se sugativează (operaţiunea se poate repeta de mai multe ori pentru a se obţine o clarificare corespunzătoare)
— montare în balsam

Colorarea durează 3—4 minute.

Colorarea rapidă cu hematoxilină-eozină

— alcool 90° 1—2 secunde
— alcool absolut 1—2 secunde
— xilol cca 2 secunde pentru clarificare
— alcool absolut 1—2 secunde
— alcool 90° 1—2 secunde

— hematoxilină 2 minute
— clătire în apă de robinet
— alcool acidulat 1%
— spălare în apă de robinet în amestec cu cîteva picături de soluţie apoasă saturată de carbonat de litiu — cca 30 secunde (pînă secţiunile devin albastre)
— eozină 1% 10—15 secunde
— umezire cu alcool 90° şi sugativare (dacă secţiunile sînt lipite pe lame)
— umezire cu alcool absolut şi sugativare
— xilol
— montare în balsam.

Colorarea durează cca 5 minute.

Un examen cu durată scurtă se foloseşte şi pentru depistarea siderocitelor şi a stazei capilare din jurul venei centro-lobulare, prezente în cazul anemiei infecţioase a calului. În acest scop piesele recoltate prin biopsie hepatică se prelucrează prin fixare rapidă şi apoi prin incluzie în parafină. Secţionarea, colorarea şi montarea permit evidenţierea acestor modificări cu o ridicată valoare diagnostică.

Metode curente de diagnostic hematologic

Sîngele și aparatul hematopoetic participă activ la procesele metabolice permanente ale organismului, asigurînd, pe lîngă schimburile gazoase și de substanțe dintre acestea și mediu, și o constantă adaptare la diferitele condiții nou apărute. Sîngele asigură, prin circulația sa în patul vascular, corelația dintre diferite organe și funcții, el fiind în același timp mediul în care se desfășoară o serie de procese metabolice.

În cursul diferitelor procese patologice sîngele suferă și el o serie de modificări față de valorile considerate normale speciei, modificări care pot constitui indicii importante pentru diagnostic, prognostic și tratament. Astfel de exemplu, în anemia infecțioasă a calului se constată pe lîngă scăderea substanțială a numărului de hematii și apariția formelor tinere; în leucozele mamiferelor pot apărea o serie de modificări ale seriei leucocitare care furnizează date prețioase pentru diagnostic. Există apoi anemiile oligocitemice aplastice de natură alimentară, ca și o gamă întreagă de modificări ale formulei leucocitare (eozinofilia din dermatita eozinofilică, limfocitoza din bolile infecțioase cronice, bazofilia din unele forme de leucoză etc.), care pot fi stabilite cu precizie printr-un examen hematologic corespunzător.

Examenul hematologic constă în efectuarea unor determinări cantitative și calitative, dintre care le redăm pe cele mai importante.

1 – Numărarea globulelor roșii

În principiu, se realizează prin numărarea directă, la microscop, a celulelor conținute într-un volum constant de lichid, diluat într-o proporție cunoscută. Diluarea este necesară, pe de o parte pentru a se evita coagularea, iar pe de altă parte, pentru că globulele roșii, fiind foarte numeroase, nu s-ar putea număra nediluate.

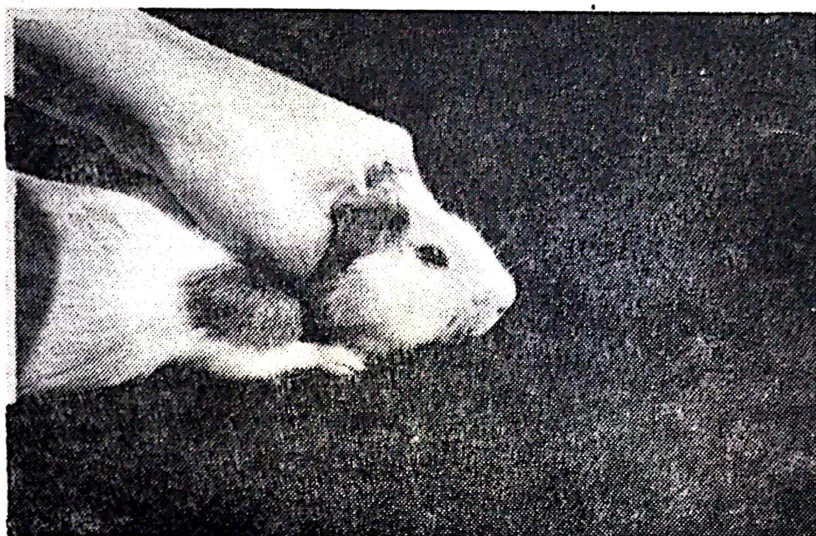
În vederea numărătorii sînt necesare următoarele:

— Ace pentru puncție, alcool, vată, eter

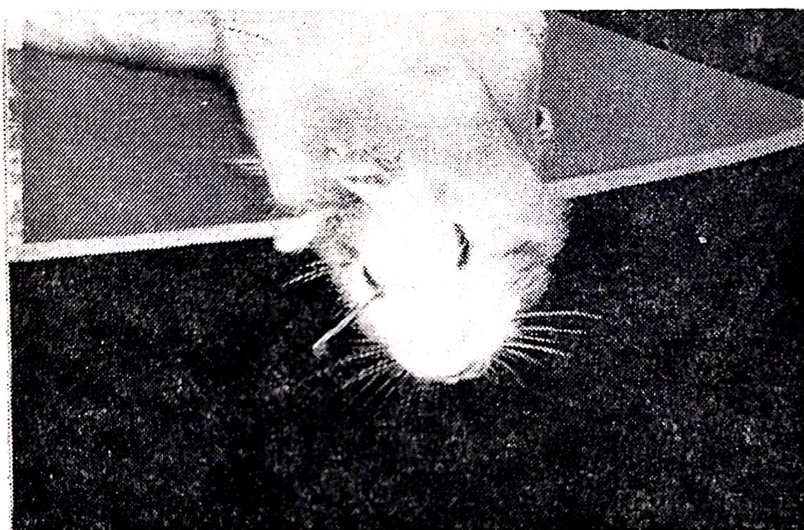
— Lichid de diluție; cel mai frecvent folosit, pentru mamifere, este lichidul Hayem (NaCl 1 g, sulfat de sodiu 5 g, sublimat 0,5 g, apă distilată 200 ml). Înainte de utilizare soluția trebuie filtrată prin hîrtie de filtru. Ea nu trebuie să fie mai veche de 3 săptămîni.

— Pipetă Potain pentru globule roșii — compusă dintr-un tub capilar gradat și o bulă de diluție cu o perlă mobilă în interior; tubul ca-

4



a



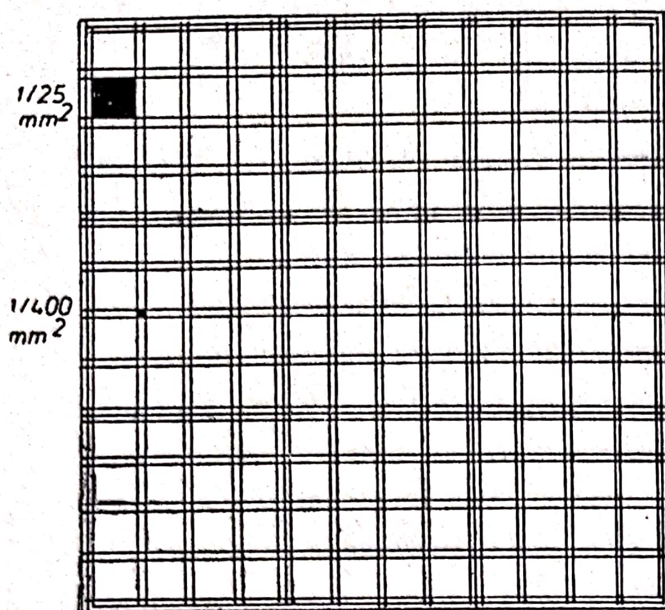
b

Fig. 123 — Recoltarea sîngelui din sinusul venos la cobai
a — contenţia ; *b* — recoltare propriu-zisă

pilar este împărţit în 10 gradaţii, la mijloc există gradaţia 0,5, la baza bulei gradaţia 1, iar deasupra bulei gradaţia 101. Dacă sîngele este aspirat pînă la gradaţia 0,5, iar restul pînă la 101 se completează cu lichid diluant, se obţine diluţia 1/200; dacă se aspiră sînge pînă la gradaţia 1, iar restul diluant, se obţine diluţia 1/100. În cazul în care numărătoarea va fi făcută din sînge recoltat pe anticoagulant, este necesar ca înainte de aspirarea în pipetă Potain să se încline flaconul de cca 30 ori, pentru a realiza o cît mai bună omogenizare; agitarea se va face încet pentru a evita producerea hemolizei.

— Camerele de numărare sînt dispozitive din sticlă care au gravate suprafeţe exact determinate, vizibile la microscop şi care delimitează cîmpurile pe care se efectuează numărătoarea. După modul cum sînt gravate aceste suprafeţe, există mai multe tipuri de camere:

a) Camera Thoma — delimitează o suprafaţă de 1 mm^2 care este împărţită în 400 pătrăţele, suprafaţa unui pătrăţel fiind de 1/400 mm^2.



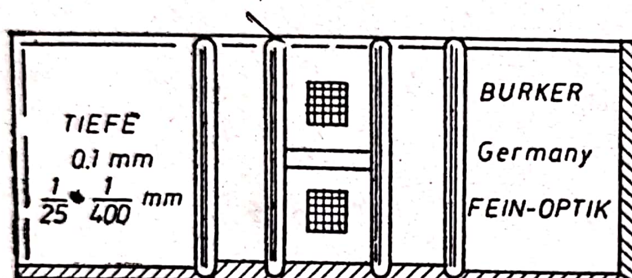


Fig. 124 — Camera Bürker

Pe suprafața de 1 mm² sînt delimitate 16 pătrățele mari prin linii triple.

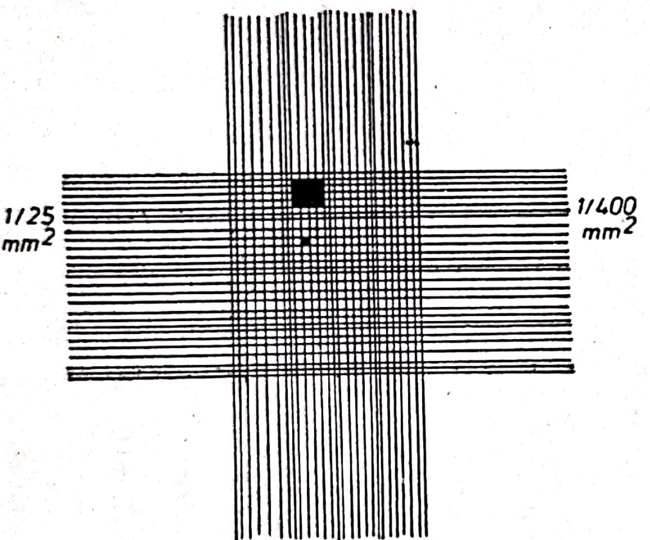
b) Camera Bürker — are o suprafață de 9 mm² împărțită în 9 pătrate a 1 mm², delimitate prin linii triple. Fiecare milimetru pătrat este subîmpărțit prin linii duble în 16 pătrate. La întretăierea liniilor duble se înscriu pătrate mici, care reprezintă 1/400 dintr-un milimetru pătrat.

c) Camera Bürker-Türck are o suprafață de 9 mm², împărțită în 9 pătrățele a 1 mm² prin linii triple. Pătratul din mijloc de 1 mm² este de tipul Thoma, fiind împărțit în 400 pătrățele mici a 1/400, care folosește la numărătoarea eritrocitelor, iar pătratele din colțuri, împărțite la rînul lor în cîte 16 pătrățele mici, servesc la numărătoarea elementelor albe.

d) Camera Goreaev — are un cadrilaj în care alternează pătrățelele mici de 1/400 dintr-un milimetru pătrat pentru eritrocite, în grupuri de cîte 16, cu pătrate pentru leucocite.

— Microscopul. Se lucrează cu obiectiv 40 și ocular 10 sau 7.

Tehnica de numărare. Se face puncția unei regiuni periferice (ureche, buză) și după eliminarea primei picături de sînge se aspiră cu pipeta pînă la diviziunea 0,5 sau 1, în funcție de diluția dorită (1/200 sau 1/100). Dacă sîngele depășește ușor diviziunea, prin atingerea vîrfului pipetei cu hîrtie de filtru sau vată, se aduce coloana exact pînă la gradație. Se aspiră apoi lichidul de diluție pînă la diviziunea 101, se așază pipeta în poziție orizontală, se astupă cele două capete cu degetul mare și cel mijlociu și se agită pentru omogenizare 2—3 minute, apoi se aplică lamela pe camera de numărat și după scurgerea primelor picături din pipetă, pe hîrtie de filtru, se apropie vîrful pipetei de marginea camerei acoperită cu lamela și se lasă să intre prin capilaritate în cameră o cantitate de sînge diluat, încît spațiul dintre lamă și lamelă să fie umplut în întregime, fără ca lichidul să treacă în șanțurile laterale și fără ca lamela să se deplaseze sau să intre bule de gaz. În caz contrar, operațiunea se repetă după ștergerea camerei. Se așteaptă cîteva minute pentru sedimentarea elementelor pe cadrilaj și se pune camera la microscop, efectuîndu-se numărătoarea. Se vor număra 5 pătrate mijlocii, care conțin cîte 16 pătrățele mici de 1/400 mm² deci în total 80 pătrățele mici.



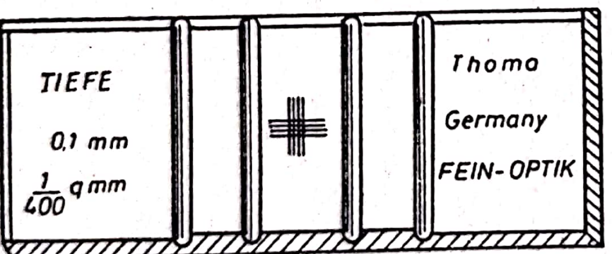
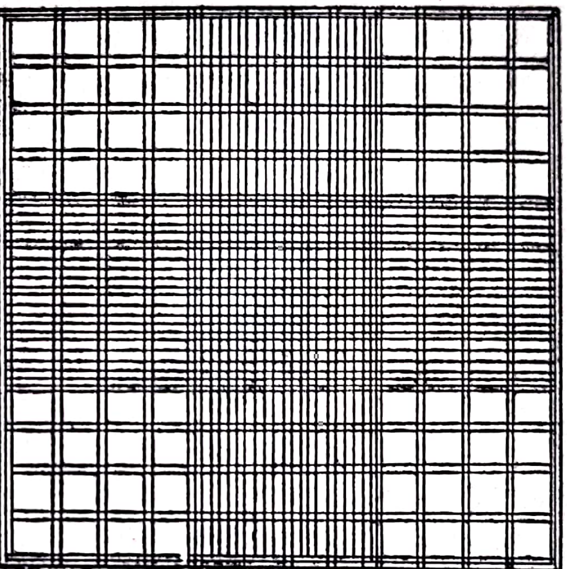


Fig. 125 — Camera Thoma



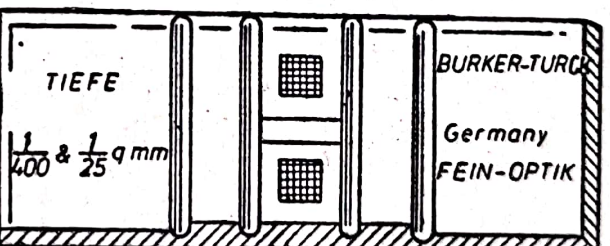


Fig. 126 — Camera Bürker-Türck

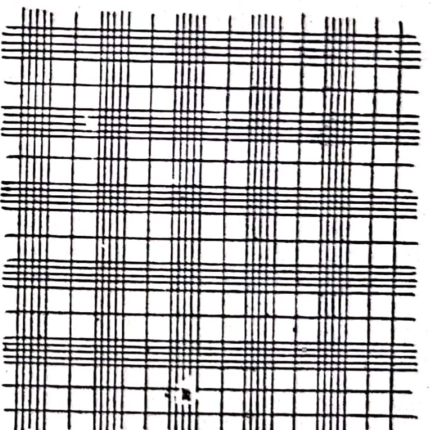


Fig. 127 — Camera Goreaev

Pentru a nu se număra același element de două ori, în cazul celor aflate pe linie, se vor număra întotdeauna cele aflate pe două laturi, de exemplu sus și stînga. Pentru a afla numărul total de hematii pe milimetru cub se va înmulți numărul hematiilor numărate cu 10 000 în cazul că diluția a fost de 1/200 și cu 5 000 dacă diluția a fost 1/100.

La păsări, pentru numărarea globulelor roșii se întrebuințează aceleași pipete Potain și camere de numărat, dar lichidul de diluție diferă de cel utilizat pentru mamifere, și anume:

Lichidul Wiesman — se compune din:

— Fucsină	50 mg
— Formalină neutră	5 ml
— Soluție Ringer	95 ml

Tehnica de lucru este identică cu cea de la mamifere, eritrocitele apărînd nucleate și colorate în trandafiriu.

O altă metodă (metoda Cosma) utilizează ca lichid diluant următoarea soluție de bază:

— Clorură de sodiu	1,0 g
— Biclorură de mercur	0,8 g
— Citrat de sodiu	0,3 g
— Oxalat de amoniu	0,1 g
— Apă distilată ad	100,0 ml

Se prepară apoi cu ajutorul acestei soluții de bază, o soluție de eozină 1% și o soluție de albastru de tripan 1%.

Soluția diluantă de lucru va fi obținută din:

— Soluție de eozină 1%	8,0 ml
— Soluție de albastru de tripan	4,0 ml
— Soluție de bază	100,0 ml

Tehnica de lucru este aceeași ca la mamifere, cu mențiunea că citirea trebuie să se facă după 20—30 minute din momentul diluării sîngelui cu acest lichid. Metoda are avantajul că permite atît numărarea eritrocitelor cît și a leucocitelor și trombocitelor.

Erorile care pot surveni în cursul numărării globulelor roșii se pot datora unei spălări defectuoase, coagulării sîngelui înainte de diluare, sedimentării globulelor în pipetă înainte de introducerea în camera de numărat sau numărării defectuoase a pătrățelelor.

Pentru a evita asemenea erori, ca și din rațiuni privitoare la mîna de lucru, de timp și expeditivizarea testărilor la ora actuală se tinde spre folosirea din ce în ce mai largă a metodelor de determinare automată. Ea se bazează pe folosirea unor aparate electronice de tipul Celescopului (AB Lars Ljungberg and Co, Stockholm), Erymat-ului sau a celui de tip Coulter Counter, acesta din urmă permițînd efectuarea unui mare număr de teste (numărători de globule roșii și albe, PCV, Hb, VEM, HEM, CHEM) dintr-un volum foarte mic de sînge (1 ml) într-un timp extrem de scurt — 20 de secunde.

2 — Numărarea elementelor albe

Valoarea clinică a numărului de leucocite este superioară numărătorii globulelor roșii prin semnificația pe care o are în stabilirea diagnosticului diferitelor boli. Ea constituie ca urmare un test indispensabil pentru orice investigație hematologică.

Se procedează în principiu de aceeași manieră ca și în cazul elementelor roșii; în acest scop se folosesc însă pipete Potain special destinate numărării leucocitelor și un lichid diluant care conservă numai elementele nucleate, hematiile fiind lizate (lichidul Türck, format din acid acetic 1 ml, apă distilată 100 ml și albastru de metilen 1% cîteva picături). Pipeta pentru diluție are un tub capilar cu 10 gradații, două notații: 0,5 și 1, urmate de o bulă de diluare și, în fine, notația 11. Diluația sîngelui recoltat pînă la gradația 0,5 este de 1/20 iar a celui recoltat pînă la gradația 1 de 1/10.

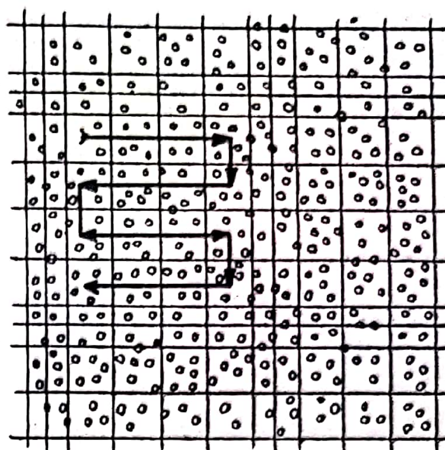


Fig. 128 — Modul de numărare a elementelor albe

Tehnica de numărare. Se recoltează sîngele prin puncția unei regiuni periferice, se diluează cu lichid Türck în pipeta Potain și, după omogenizare, se pune în camera de numărat. Se vor număra cîteva (4—5) cîmpuri de cîte 1 mm² (în întregime) și se face media leucocitelor numărate pe un cîmp. Această medie se înmulțește cu diluția (1/10 sau 1/20) și cu înălțimea camerei (1/10), practic cu 200 sau cu 100, după cum în pipetă s-a aspirat sînge pînă la diviziunea 0,5 sau 1.

Trebuie menționat însă că prin această metodă sînt numărate toate elementele nucleate, deci și eritroblaștii, care sînt hematii neajunse la maturație. De aceea pentru a face o apreciere reală a numărului de globule albe, din cifra totală obținută se va scădea un procent egal cu cel al eritroblaștilor obținuți la formula leucocitară. De exemplu, dacă la

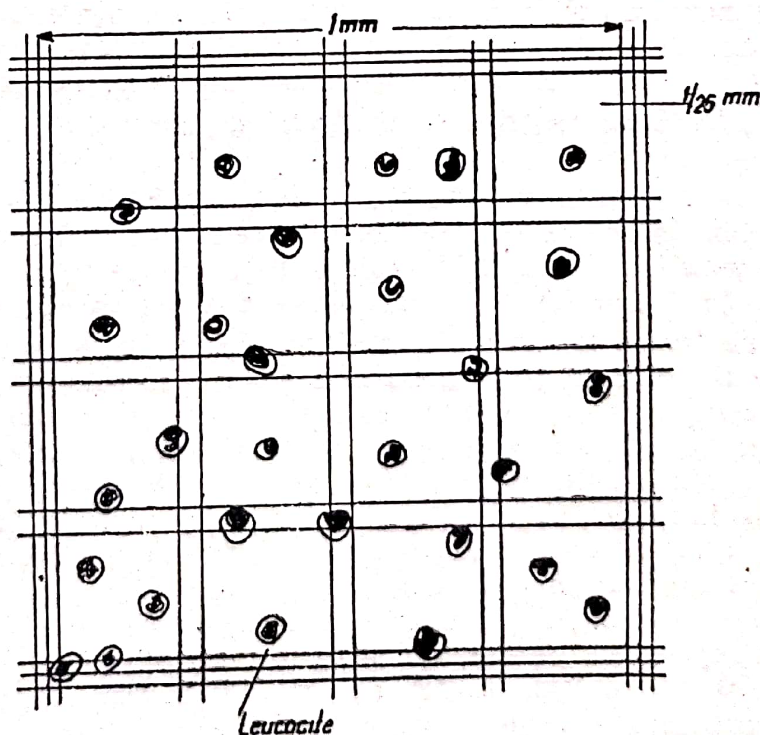


Fig. 129 — Numărarea elementelor albe

determinarea formulei leucocitare se obțin 10 eritroblaști la 100 elemente numărate, numărul de leucocite real va fi cu 10% mai mic decît cel obținut la numărătoarea elementelor albe.

În cazurile de leucocitoză se poate face o diluție mai mare a sîngelui (1 : 200) folosind o pipetă pentru eritrocite în care se aspiră sînge pînă la diviziunea 0,5 și lichid de diluție pînă la 101, factorul de corecție în acest caz fiind $10 \times 200 = 2000$. Spre exemplu, dacă cifra medie este de 50 leucocite/1 mm^2, rezultatul va fi: $50 \times 200 = 100\,000$ leucocite/mm^3.

În leucopenii, se procedează dimpotrivă la micșorarea diluției, respectiv 1 : 10 în loc de 1 : 20, încît cifra medie obținută se va înmulți cu 100.

3 – Numărarea eozinofilelor

Folosește pentru diluare o soluție de acetonă-eozină (eozină soluție apoasă 2% — 5 ml, acetonă 5 ml și apă distilată 90 ml), pipeta pentru leucocite și camera Nageotte sau Bürker. Eozinofilele vor fi ușor colorate, în timp ce celelalte elemente vor fi lizate. Pe determinarea numărului de eozinofile se bazează testul Thorn, pentru decelarea integrității funcției corticosuprarenale. La indivizii normali, cu cortexul suprarenal intact, administrarea de ACTH atrage după sine scăderea eozinofilelor circulante.

4 – Numărarea trombocitelor

Numărarea trombocitelor constituie unul din testele principale utilizate în investigarea sindroamelor hemoragice. Ea întîmpină însă o serie de dificultăți datorate pe de o parte faptului că trombocitele aglutinează, se fragmentează și se dezintegrează rapid, iar din cauza dimensiunilor reduse sînt ușor confundate cu diferite impurități și artefacte, iar pe de altă parte, din cauza erorilor, uneori inerente, de tehnică.

La ora actuală se practică două tipuri de metode: indirecte și directe.

Metoda indirectă este metoda prin care se stabilește proporția trombocitelor la 1000 de eritrocite, prin examinarea unui frotiu colorat, după care se raportează la numărul de eritrocite cuprinse într-un mm^3, calculîndu-se în final numărul de trombocite din 1 mm^3 de sînge.

Tehnica de lucru. Se aplică o picătură de sulfat de magneziu 10% pe locul unde urmează să se facă puncția și prin aceasta se puncționează pielea, amestecîndu-se cu colțul unei lamele sau cu o baghetă fină de sticlă, picătura de sînge rezultată cu sulfatul de magneziu (acesta are rolul de a împiedica aglutinarea spontană a trombocitelor), din amestecul rezultat făcîndu-se frotiuri. Acestea se usucă rapid la aer (eventual se poate fixa după uscare cu alcool metilic timp de 10 minute sau cu o soluție formată din sublimat corosiv 0,1 + acid acetic glacial 6 picături + alcool absolut 100 ml), după care se colorează cu soluție Giemsa dublu concentrată, timp de 30 minute, sau prin metoda May Grünwald Giemsa timp de 40—50 de minute. Se examinează la microscop, numărîndu-se trombocitele întîlnite la 1000 de eritrocite (pentru ușurarea numărătorii este bine să se folosească un ocular special — Ehrlich, care delimitează

cîmpul de numărare). Cunoscînd numărul de eritrocite/mm³ și aplicînd regula de trei simplă, se calculează numărul de trombocite/mm³. De exemplu: la 1000 eritrocite s-au găsit pe frotiu 45 trombocite; numărul de globule roșii/mm³ fiind de 3 200 000 rezultă că:

$$\text{Nr. de trombocite/mm}^3 = \frac{3\,200\,000 \times 45}{1\,000} = 45 \times 3200 = 144\,000/\text{mm}^3$$

Metoda are dezavantajul că poate da rezultate eronate fie din cauza repartiției inegale a trombocitelor pe suprafața frotiului de sînge, fie a amestecului neomogen al sulfatului de magneziu cu picătura de sînge etc. Pentru aceste motive se optează pentru numărarea directă a trombocitelor cu ajutorul hemocitometrelor, fără a se renunța însă la examinarea acestor elemente pe frotiul de sînge, nu în scopul stabilirii numărului de trombocite ci pentru a surprinde eventuale modificări morfologice ale acestora, semnificative pentru unele stări patologice.

Metoda directă (van Herwerden) se execută după aceeași tehnică utilizată la numărarea globulelor roșii, cu diferența că lichidul de diluție are o altă compoziție și anume:

— Uree	0,70 g
— Apă distilată	7,0 ml
— Soluție de clorură de sodiu 9%	3,0 ml
— Albastru de crezil (urme)	

Într-o pipetă Potain pentru globule roșii se face o diluție 1% (preferabil din sînge venos), se agită cîteva minute și se lasă apoi în repaos 30 minute pentru producerea hemolizei. Se agită din nou 1—3 minute, se aruncă primele picături din pipetă și apoi se încarcă camera de numărat. Se procedează la numărarea trombocitelor după același sistem ca la globulele roșii. Trombocitele apar ca mici discuri refringente, cu tentă albastră.

Un lichid de diluție îmbunătățit este cel recomandat de Popa, Enache și Nicoară; el asigură prin conținutul în oxalat de amoniu, un efect eritrocitolizant superior, pe de o parte, iar pe de altă parte, prin anticoagulantul utilizat — Na_2EDTA se asigură conservarea și împiedică aglutinarea trombocitelor.

Compoziția acestui lichid de diluție este următoarea:

— Na_2EDTA	0,01 g
— Oxalat de amoniu	1,0 g
— Apă distilată ad	100,0 ml

Durata de păstrare a diluantului este lungă și nu necesită condiții speciale de conservare.

Diluțiile pot fi făcute în pipete Potain pentru leucocite (1 : 20), fie în cele pentru eritrocite (1 : 100). După încărcare pipeta se agită 1—2 minute, se îndepărtează primele 3—4 picături și apoi se încarcă camera de numărat. Se lasă în repaus cca 15 minute pentru a se produce liza hematiilor și sedimentarea trombocitelor (camera se așază pe o hîrtie de filtru umedă într-o placă Petri și se acoperă, pentru ca în timpul necesar sedimentării să nu se producă evaporarea lichidului). Se examinează la microscop cu obiectiv 10, ocular 10, în lumină obișnuită sau cu condensatorul coborît. Pe fondul cenușiu creat, trombocitele apar ca mici sfere strălucitoare, mobile.

Erorile care pot apărea în cursul numărătorii trombocitelor se pot datora mai multor cauze: amestec neomogen al sîngelui cu diluantul, erori de numărat, erori ale pipetei, erori de diluţie, erori de recoltare, distrugerea unei părţi din trombocitele care vin în contact cu suprafeţele de sticlă, erori datorate contaminării lichidului de diluţie, a pipetei sau camerei de numărat, cu impurităţi. Pentru a se evita această ultimă posibilitate de eroare, este bine să se facă o numărătoare „la alb", numai cu lichid de diluţie, fără sînge. Prezenţa a peste 5000 corpusculi/mm^3 impune centrifugarea şi filtrarea lichidului de diluţie şi curăţirea pipetei şi a camerei de numărat cu alcool. De asemenea, pentru a se evita distrugerea trombocitelor este bine să se folosească sticlă siliconată. Numărătoarea directă a trombocitelor trebuie însoţită de controlul acestora pe un frotiu colorat, iar rezultatele obţinute trebuie coroborate cu alte teste ale hemostazei: timpul de sîngerare, retracţia cheagului etc.

5 – Numărarea reticulocitelor

Determinarea numărului de reticulocite (eritrocite imature, cu citoplasmă oxifilă) reprezintă un test specific foarte important pentru cunoaşterea mecanismului de producere şi pentru urmărirea tratamentului diferitelor tipuri de anemii, dînd indicaţii preţioase referitoare la capacitatea de regenerare a măduvei osoase.

În vederea efectuării acestui test, se pregăteşte o capsulă parafinată în care se pun 25 cm^3 soluţie alcoolică sau salină 1% albastru de crezyl brillant + 25 cm^3 soluţie de citrat de sodiu 3,8%.

Soluţia salină de albastru de crezyl brillant se obţine din:

— albastru crezyl brillant	1,0 g
— ser fiziologic 9‰	100,0 ml

Soluţia alcoolică conţine:

— albastru crezyl brillant	0,4 g
— alcool etilic 95%	100,0 ml

Ambele soluţii trebuie filtrate înainte de utilizare.

În capsula astfel pregătită se introduc 3—5 picături de sînge, se amestecă prin agitare temeinică şi se pune totul într-o cameră umedă unde se lasă 30 de minute în repaus. După acest interval de timp se agită din nou pentru a realiza o cît mai bună omogenizare şi se extrage cu ajutorul unei baghete parafinate o picătură din amestec, se depune pe o lamă, efectuîndu-se un frotiu obişnuit. Frotiul se usucă prin agitare la aer, se fixează timp de 2 minute cu alcool metilic şi se colorează 15 minute cu soluţie Giemsa, preparată ex tempore din 15 picături sol. Giemsa-mamă + 10 ml apă distilată neutră. Se lasă să se usuce la aer şi se examinează cu un obiectiv de imersie, folosind acelaşi ocular Ehrlich ca şi pentru trombocite, determinînd numărul de reticulocite la 1 000 de hematii normale. Tehnica de numărare şi modul de calcul sînt identice cu cele pentru trombocite.

Reticulocitele au dimensiuni asemănătoare macrocitelor; în urma coloraţiei cu albastru de crezyl brillant, în citoplasmă se evidenţiază substanţa reticulo-filamentoasă sub forma unor granule de dimensiuni diferite, de culoare albastră, răspîndite pe toată suprafaţa celulară, alcătuind

adesea o rețea arborescentă. Integritatea acestei rețele și prezența granulațiunilor mari, denotă vîrsta tînără a celulelor, caractere ce diminuă pe măsura maturării elementelor roșii.

În măduva hematogenă, reticulocitele se găsesc în număr mare în timp ce prezența lor în sîngele periferic normal este sporadică, fiind variabilă cu specia și vîrsta animalelor.

Reticulocitoza poate fi constatată în unele forme de anemii cum sînt cele posthemoragice, anemiile hemolitice cronice, în intoxicații cu plumb, arsenic, precum și după transfuziile de sînge, sau după splenectomii. În schimb, în anemiile aplastice numărul reticulocitelor este foarte redus sau nul.

6 – Dozarea hemoglobinei

În principiu, constă în obținerea unei soluții de clorhidrat de hematină din sîngele de cercetat, care se compară colorimetric cu un etalon stabilit pentru cantitatea normală de hemoglobină de 16 g/100 ml sînge.

Pentru determinare sînt necesare:

— hemoglobinometru Sahli
— o pipetă capilară cu o capacitate de 20 mm³
— o pipetă Pasteur
— o baghetă de sticlă pentru omogenizare
— acid clorhidric n/10.

Tehnica de lucru. Se pune în tubul gradat al hemoglobinometrului acid clorhidric n/10 pînă la diviziunea 10. Se recoltează sîngele pînă la diviziunea unică a pipetei, avîndu-se grija de a șterge vîrful acesteia de urmele de sînge din exterior. Se introduce vîrful pipetei la fundul tubului gradat, conținînd acid clorhidric în cantitate de cîteva picături sau pînă la cea mai inferioară diviziune a eprubetei și se suflă tot sîngele, spălîndu-se pipeta de cîteva ori prin aspirări și refulări succesive. Se scoate pipeta și se agită tubul pentru a omogeniza amestecul, se așteaptă 5 minute, timp în care se formează clorhidratul de hematină, care imprimă amestecului o culoare brună-închisă. Prin diluare cu apă distilată adăugată cu picătura, se aduce culoarea amestecului la cea a etalonului cu care se compară. Cînd nuanța lichidului este identică cu aceea a etalonului, se citește gradația de pe tub la nivelul meniscului inferior al lichidului. Rezultatele se pot exprima în grame de hemoglobină la 100 ml sînge.

În dozarea hemoglobinei pot surveni erori legate de nerespectarea întocmai a tehnicii (folosirea unor pipete știrbite, neomogenizarea temeinică a sîngelui cu acidul clorhidric, începerea diluării înainte de a se fi scurs cele 5 minute etc.). Citirea trebuie efectuată numai la lumina zilei.

Se pot folosi și metode fotometrice, care dau rezultate mai exacte.

Cantitatea de hemoglobină este scăzută față de normal în anemiile de orice natură. În anemiile cronice (anemia infecțioasă), pe lîngă numărul scăzut de globule roșii/mm³, intervine faptul că acestea fiind aruncate în patul vascular de către organele hematopoetice în stare insuficient maturată, nu sînt încărcate cu cantitatea normală de hemoglobină.

7 – Determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH)

Hematiile din sîngele recoltat pe un anticoagulant sedimentează sub influența forței de gravitație, după un timp variabil cu starea fiziologică a individului, cu starea proteinelor plasmatice. Determinarea VSH se poate face prin metode diferite (Westergreen și Nevodov sînt cele mai larg răspîndite).

Materialele necesare pentru metoda Westergreen:
— seringă și ac pentru puncție venoasă
— eprubete
— pipete Westergreen — divizate de la 0 la 200
— stativ pentru fixarea pipetelor
— citrat de sodiu 3,8% (citrat trisodic)

Tehica de lucru. Într-o seringă de 10 ml se aspiră 2 ml citrat de sodiu 3,8%, se face puncția venoasă, și se aspiră în seringă sînge pînă la diviziunea care marchează 10 ml. Se face apoi omogenizarea temeinică a conținutului seringii, prin înclinări repetate, după care sîngele se trece într-o eprubetă obișnuită. Se ia apoi o pipetă Westergreen și se aspiră pînă la diviziunea zero, aflată la partea superioară a pipetei. Trebuie menționat că toate aceste operațiuni se vor efectua cît mai repede, pentru ca hematiile să nu sedimenteze. Se aplică vîrful pipetei pe dopul de cauciuc al stativului, iar capătul superior se fixează în dispozitivul cu arc al acestuia. Se notează exact ora cînd s-a fixat pipeta și se face citirea la 15, 30, 60, 120 minute și la 24 de ore, notîndu-se numărul de diviziuni la fiecare citire. Trebuie avut în vedere că folosirea altor anticoagulanți modifică VSH (de exemplu oxalatul o mărește), păstrarea sîngelui micșorează VSH (de aceea se recomandă efectuarea imediată), iar poziția înclinată o mărește (există și metode care folosesc poziția înclinată — metoda Fuente—Hito).

Factorii care influențează VSH sînt de natură eritrocitară și plasmatică; cei mai importanți sînt cei plasmatici (fibrinogenul și globulinele) care determină o anumită încărcătură electrică a hematiilor, capabilă să mențină hematiile în suspensie o perioadă mai îndelungată, prin respingerea reciprocă ce există. VSH crește în special în bolile infecțioase cronice (anemie infecțioasă) în boli infecțioase septicemice, în hemopatii (leucoze, reticuloze, mieloame). Valori scăzute ale VSH se întîlnesc în unele stări alergice.

8 – Determinarea hematocritului (PCV)

Hematocritul reprezintă raportul procentual dintre masa eritrocitară și volumul sanguin, fiind unul dintre cele mai precise examene pentru determinarea stărilor de anemie și policitemie, cu condiția respectării stricte a tehnicii de lucru. Hematocritul este totodată una din valorile necesare în determinarea unor constante eritrocitare (VEM, CHEM).

Pentru evaluarea hematocritului, sîngele făcut incoagulabil, se centrifughează cu scopul de a separa hematiile de plasmă. Se poate uza în acest scop de una din cele două metode existente: macrometoda și micrometoda (microhematocritul).

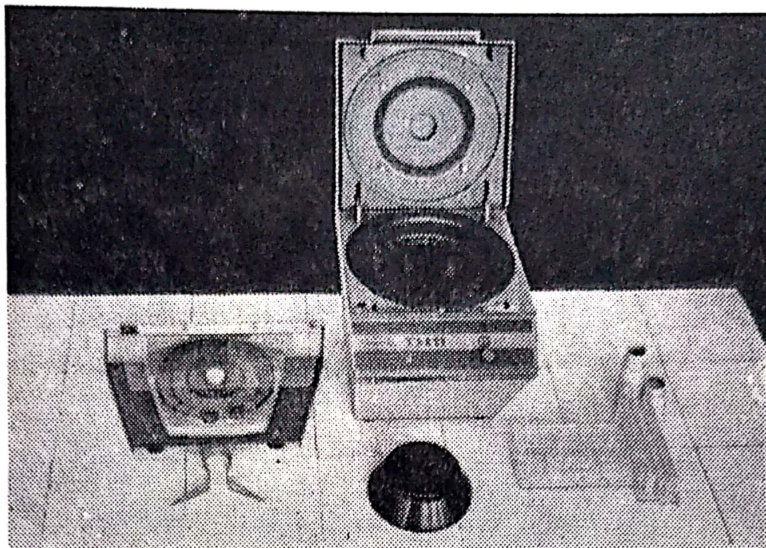


Fig. 130 — Centrifugă specială pentru hematocrit tip TH 11 — Janetzki

Macrometoda (Wintrobe)

Materiale necesare:

— instrumente pentru recoltarea sîngelui

— tub de centrifugă gradat — 10 diviziuni (se poate confecţiona din pipete Westergreen). Tuburile trebuie să fie din sticlă mai groasă pentru a rezista la centrifugare;

— anticoagulant sub formă de pulbere, pentru a nu modifica volumul plasmatic sau eritrocitar. Pentru macrometodă, cel mai indicat este amestecul de oxalaţi, folosit în proporţie de 2 mg amestec pulbere pentru 1 ml sînge (cel de 2 mg rezultă din uscarea a 0,1 ml din soluţia de oxalaţi 2%). Se mai poate folosi şi EDTA. Heparina este folosită mai mult pentru micrometodă;

— balanţă pentru echilibrarea tuburilor de centrifugă

— centrifugă.

Tehnica de lucru. Se recoltează sînge venos, avînd grijă ca acul şi seringa să fie perfect uscate pentru a nu se produce hemoliză şi se depune imediat în flaconul în care, în prealabil, s-a pus cantitatea de anticoagulant corespunzătoare cantităţii de sînge recoltată. Se omogenizează proba prin răsturnări lente (nu prin învîrtire sau clătire), după care se trece la repartizarea sîngelui în tuburile de centrifugă. Umplerea tuburilor se face cu ajutorul unei pipete Pasteur foarte bine efilată, pentru a putea ajunge în fundul tubului, de unde începe umplerea acestuia. Cantitatea de sînge aspirată în pipeta Pasteur trebuie să fie suficientă pentru a permite umplerea dintr-odată a tubului (respectiv pînă la diviziunea 10). Pe măsură ce se umple tubul pipeta se extrage progresiv, avînd grijă ca vîrful ei să fie permanent sub nivelul sîngelui şi să nu se formeze bule de aer). Dacă sîngele introdus în tub depăşeşte diviziunea 10, excesul se va îndepărta cu ajutorul unei hîrtii de filtru. După terminarea operaţiunii de umplere, tuburile se pun la centrifugă, introducîndu-se sub fiecare şi un mic tampon de vată cu scopul de a le proteja de spargere. Centrifugarea se face strict 30 de minute la 3000 turaţii/minut. Dacă se folosesc centrifuge unghiulare, este necesar ca după scoaterea tuburilor din centrifugă, acestea să fie lăsate un timp în poziţie

verticală pentru ca nivelul superior al eritrocitelor să revină din poziția oblică (rezultată în urma centrifugării) la cea orizontală. Se face apoi citirea direct, dacă tubul este gradat, sau se măsoară cu ajutorul unei rigle sau al unei hîrtii milimetrice, înălțimea coloanei de hematii (h) și înălțimea totală a coloanei de sînge (H). Calculul se face astfel:

$$h\% = \frac{100 \times h}{H}$$

De exemplu, dacă H este egal cu 50 diviziuni și h măsoară 20 diviziuni — hematocritul este de:

$$\frac{100 \times 20}{50} = 40\%$$

Deci din volumul total de sînge 40% sînt hematii iar 60% plasmă. Se are însă în vedere că, chiar dacă centrifugarea este completă, hematiile neadaptîndu-se perfect unele peste altele, între ele rămîne un spațiu cu plasmă interstițială. Ea este socotită ca fiind în general de 5% din volumul eritrocitar total. Mai există, de asemenea, și stratul leucocitar-trombocitar. El este însă în mod normal neglijat, fiind mai mic de 1%; în leucocitozele puternice (leucoze) acest strat crește considerabil și trebuie măsurat pentru a aprecia corect atît stratul eritrocitar cît și cel plasmatic.

Există unele diferențe între sîngele venos, cel arterial și cel capilar. Hematocritul arterial și mai ales cel capilar sînt mai scăzute.

Un hematocrit ridicat se constată în plasmoragii, pletoră sanguină. Un hematocrit scăzut se întîlnește în hidremie, anemii.

Constante și indici eritrocitari. Dimensiunile, forma și încărcarea cu hemoglobină a eritrocitelor se pot determina prin diferite metode de calcul matematice (metoda Wintrobe), rezultatele putînd fi exprimate prin cifre absolute (constante) sau relative față de normal (indici) sau cu ajutorul unei rigle de calcul speciale.

Dintre constantele eritrocitare, pentru practica largă se recomandă determinarea volumului eritrocitar mediu (VEM), hemoglobinei eritrocitare medii (HEM) și a concentrației eritrocitare medii în hemoglobină (CHEM).

Pentru determinarea acestora trebuie cunoscute:
— numărul de eritrocite/mm^3, în milioane ($E=10^6/mm^3$)
— hemoglobina în grame/100 ml sînge (Hb)
— hematocritul % (Ht)

Pentru determinări se folosește sînge venos recoltat pe anticoagulant pulbere (EDTA, amestec de oxalați, heparină).

9 – Determinarea volumului eritrocitar mediu (VEM)

Această constantă se calculează după formula:

$$VEM = \frac{Ht \times 10}{E}$$

Rezultatele se exprimă în microni cubi/eritrocit. Metoda are dezavantajul că în formula sa de calcul trebuie utilizat numărul de eritrocite, în stabilirea căruia apar o serie de erori inerente.

În anemia hipocromă severă, apar microcite, deci VEM este scăzut, în timp ce în anemia pernicioasă spre exemplu, eritrocitele sînt macrocite, valoarea VEM fiind deci crescută.

10 – Determinarea hemoglobinei eritrocitare medii (HEM)

respectiv a conţinutului mediu în hemoglobină al eritrocitelor, se calculează pe baza următoarei formule:

$$HEM = \frac{Hb \times 10}{E}$$

Rezultatele se exprimă în micromicrograme/eritrocit. Această metodă de determinare prezintă acelaşi dezavantaj ca şi VEM, respectiv utilizarea în calcul a numărului de eritrocite.

Valorile crescute ale HEM se datoresc unui VEM mai mare faţă de normal, în timp ce valorile sale mai mici se pot datora, fie unui VEM scăzut, fie conţinutului scăzut în hemoglobină a microcitelor. În general modificările HEM merg în paralel cu cele ale VEM.

11 – Determinarea concentraţiei în hemoglobina eritrocitară medie (CHEM)

CHEM exprimă proporţia din volumul eritrocitelor ocupată de hemoglobină. Formula sa de calcul este următoarea:

$$CHEM = \frac{Hb \times 100}{Ht}$$

Practic, este vorba de raportul greutate/volum (grame hemoglobină/unităţi hematocrit). Mai precis însă, CHEM reprezintă concentraţia medie de hemoglobină pe unitatea de volum (100 ml) de masă eritrocitară, încît rezultatele nu se exprimă în procente ci în grame/100 ml masă eritrocitară (g/100 ml).

CHEM are o semnificaţie clinică mai importantă, întrucît exprimă capacitatea funcţională a eritrocitelor, pe baza concentraţiei în hemoglobină a acestora.

Este bine ca întotdeauna rezultatele furnizate de calculul acestor constante eritrocitare să fie confruntate cu examenul eritrocitelor pe frotiul de sînge colorat.

Cu ajutorul constantelor eritrocitare prezentate se poate preciza tipul morfologic (normocitare, macrocitare, microcitare) şi cromic (normocrom şi hipocrom) al unei anemii, elemente preţioase pentru indicaţiile terapeutice.

12 – Determinarea timpului de sîngerare

Locul de elecţie obişnuit pentru această probă este conchia auriculară (uneori şi mucoasa buzei inferioare sau pielea de pe abdomen).

Puncţionarea se face de preferinţă cu o lanţetă Francke (sau un alt instrument tăios) reglată pentru o profunzime constantă de 3 mm pentru

animalele mari, 1 mm sau sub 1 mm pentru cele mici. Se sugativează din 30 în 30 secunde sîngele care iese prin locul de puncţie, pînă cînd sîngerarea încetează (pe sugativă nu mai apare nici o pată de sînge). Se împarte numărul petelor de pe sugativă la 2, rezultînd timpul de sîngerare în minute.

Dat fiind faptul că timpul de sîngerare determinat prin această metodă este influenţat de o serie de factori (starea peretelui vascular, factori intra- şi extravasculari) s-a preconizat înlocuirea acesteia cu alte procedee de testare şi anume „viteza de picurare" şi „timpul de picurare".

Astfel, la cabaline, se introduce în vena jugulară un ac nr. 14, după ce în prealabil s-a făcut staza cu ajutorul garoului, numărîndu-se picăturile pe unitatea de timp.

Prelungirea timpului de sîngerare, în condiţiile unui timp de coagulare normal indică o trombocitopenie (se verifică şi încărcarea şi aspectul trombocitelor pe un frotiu de sînge colorat). O astfel de modificare apare în cursul unor boli infecţioase cu sindrom de leucopenie cu agranulocitoză sau trombastenii, în cursul septicemiilor, în intoxicaţiile cu substanţe ce conţin în structura lor nucleul benzoic, în cursul autointoxicaţiior — azotemie.

13 – Determinarea timpului de coagulare

Timpul de coagulare poate fi determinat prin una din metodele descrise mai departe.

Metoda lamelor. Pe 3 lame bine degresate cu alcool-eter, se picură cîte o picătură de sînge. Se notează cu precizie momentul depunerii picăturilor pe lame, după care lamele se vor aşeza sub un clopot de sticlă (sau în plăci Petri cu capac) pentru a se limita evaporarea. Se verifică la intervale de 30 secunde, consemnîndu-se începutul coagulării din momentul în care înclinînd lama, picătura de sînge nu se mai deformează.

Metoda eprubetelor. Se aleg două eprubete mici pentru hemoliză, de calibre egale, perfect curate şi uscate (preferabil cu fund plat), în care se repartizează cantităţi egale de sînge (2—4 ml); se astupă eprubetele de reacţie cu dopuri de vată şi se ţin în poziţie verticală preferabil la temperatura de 37°C. Se înclină din minut în minut una din eprubete, pînă cînd nivelul superior al sîngelui nu se mai deformează. În continuare se procedează în acelaşi fel şi cu cea de a doua eprubetă. Timpul de coagulare este dat de intervalul scurs din momentul recoltării (aspirării) sîngelui în seringă şi pînă la apariţia coagulării în cea de a doua eprubetă.

Întrucît aceste metode sînt departe de a oferi date exacte cu privire la coagulabilitatea sîngelui, se tinde ca acest factor să fie apreciat pe baza determinării unor timpi intermediari care intervin în procesul atît de complex al coagulării. Astfel sînt: timpul de protrombină (reprezintă timpul de coagulare al sîngelui oxalatat, recalcifiat optimal şi cu o concentraţie optimă de trombochinază). În această situaţie, coagularea depinde numai de concentraţia în protrombină (timpul de protrombină al sîngelui de cercetat raportat la timpul de protrombină al sîngelui normal reprezintă valoarea protrombinică).

Timpul de coagulare este mărit în unele boli infecţioase cum sînt jigodia, tuberculoza în fază avansată, gurmă, sau în cazuri de ascită, anemie, leucemie, stări hemolitice consecutive unor afecţiuni cardiace, hepatice, hipotiroidie, intoxicaţii cu trifoi, anemia infecţioasă a calului.

Reducerea timpului de coagulare se întîlneşte în cazurile de carenţe nutritive, enterite, bronşite cronice, pneumonie lobară, febră peteşială, mioglobinemie paralitică, tromboză, hemoglobinemii, în urma administrării unor substanţe medicamentoase: săruri de calciu, vitamina C ş.a.

Cu toate că şi această metodă este influenţată de o serie de factori, totuşi prezintă un procent mult mai mare de siguranţă comparativ cu metoda pe lamă.

14 – Examenul morfologic al sîngelui

Stabilirea unui diagnostic hematologic complet şi corect necesită în mod obligatoriu şi investigaţii privind morfologia elementelor figurate ale sîngelui pe frotiu, care trebuie să cuprindă următoarele aspecte:

— raportul procentual al diferitelor tipuri de leucocite (formula leucocitară)

— aprecierea dimensiunilor, formei şi încărcării cu hemoglobină a eritrocitelor

— aprecierea numărului şi morfologiei trombocitelor

— aprofundarea studiului celulelor anormale care apar eventual în frotiu, prin metode şi tehnici de colorare specifice fiecărei serii celulare

— examenul frotiurilor de măduvă osoasă pentru precizarea aspectelor legate de maturaţia diverselor celule şi de procesul de proliferare a acestora.

În cazurile în care efectuarea puncţiei medulare nu este posibilă din anumite motive iar examenul unui frotiu obişnuit de sînge nu oferă date suficiente pentru precizarea diagnosticului unor hemopatii, se poate recurge la metoda îmbogăţirii frotiului de sînge în leucocite şi trombocite, respectiv la leucocitoconcentrare.

Utilizarea concentratului leucocitar în studiile de morfologie a sîngelui are indicaţii deosebite în următoarele cazuri:

— în stările de leucopenie cînd datorită numărului redus de leucocite, unele tipuri de celule nu pot fi surprinse pe frotiul obişnuit;

— în determinarea intensităţii unor reacţii citochimice la nivelul diferitelor elemente figurate ale sîngelui (fosfataza alcalină leucocitară, glucide, lipide ş.a.);

— în scopul evidenţierii în frotiu a unor elemente celulare anormale (megakariocite, limfoblaşti, leucoblaşti, plasmocite, celule reticulare şi reticuloendoteliale, celule tumorale) care scapă tehnicilor uzuale ale frotiului clasic.

Pentru numeroasele sale avantaje, la ora actuală se tinde ca această metodă să fie introdusă ca probă curentă de diagnostic hematologic.

Tehnica îmbogățirii frotiului în leucocite și trombocite

Reactivi:
— Na_2EDTA 5,0 g
— NaCl 9‰ 100,0 ml

Tehnica de lucru. Într-un tub conținînd 1 ml soluție Na_2EDTA 5% în ser fiziologic se pun 9 ml sînge venos, omogenizîndu-se prin răsturnarea tubului de cîteva ori. Se lasă apoi tubul în poziție verticală timp de 2—3 ore, la temperatura camerei, pentru sedimentarea eritrocitelor.

Plasma supernatantă se decantează cu o pipetă Pasteur și se trece într-o eprubetă de centrifugă. Se centrifughează timp de 10 minute la 2 000 ture/minut, după care se îndepărtează plasma, cu excepția unei foarte mici cantități, care se amestecă cu sedimentul celular rămas și din care se vor face frotiuri subțiri, care se usucă rapid prin agitare la aer.

Prin aceste manopere leucocitele și trombocitele rămîn intacte sub aspect morfologic și biochimic, cu excepția monocitelor care pot prezenta vacuole în citoplasmă și nucleu.

Efectuarea frotiurilor de sînge

Materiale necesare:
— lame foarte curate, degresate și perfect uscate
— lame șlefuite cu colțurile tăiate

Tehnica de lucru. După puncția efectuată conform tehnicilor expuse anterior, cu colțul lamei șlefuite se ia o picătură mică de sînge (cca 3 mm

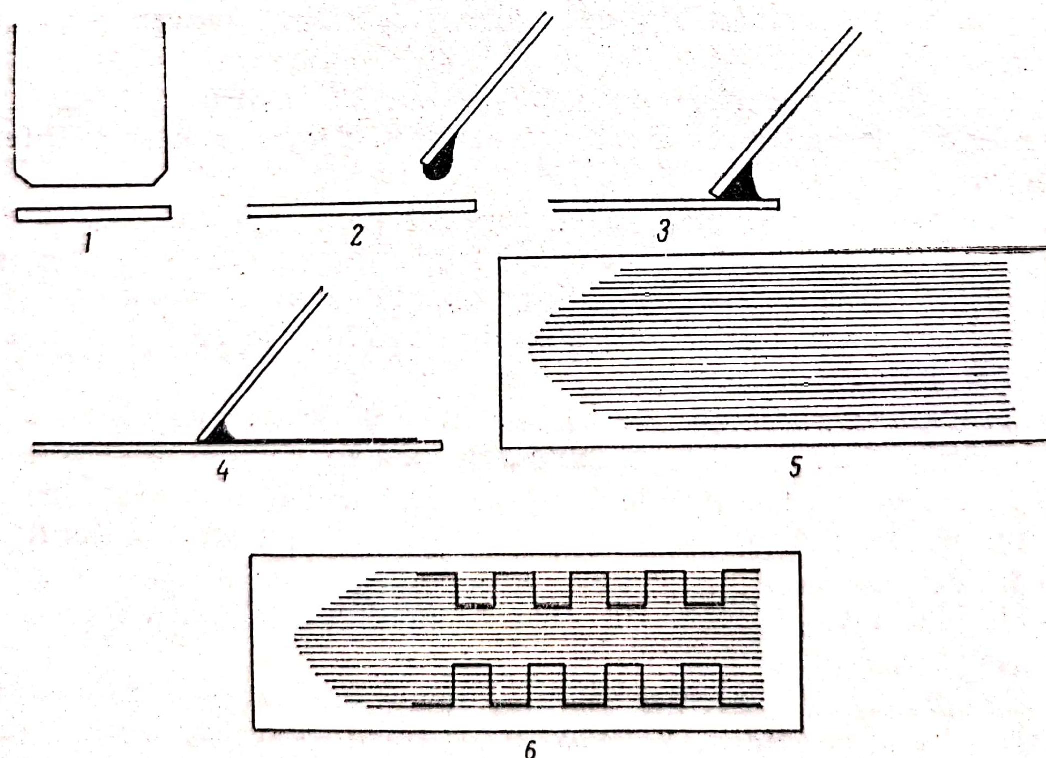
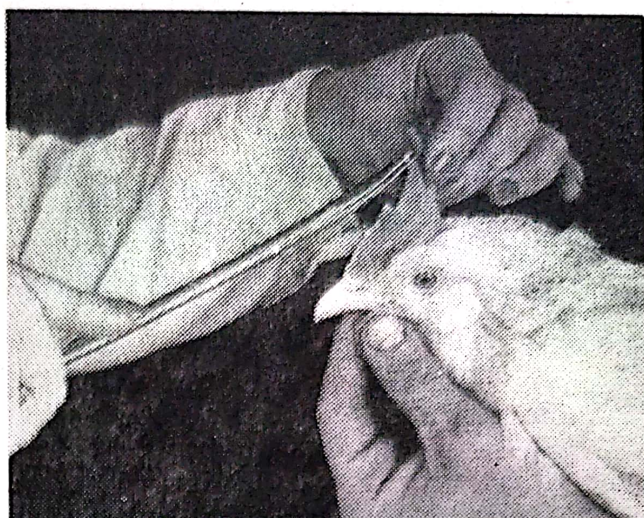


Fig. 131 — Modul de efectuare a frotiului de sînge și citirea în vederea stabilirii formulei leucocitare

1 — lama șlefuită; *2* — luarea picăturii pe lama șlefuită; *3* — întinderea picăturii pe marginea lamei șlefuite; *4* — etalarea pe lamă; *5* — aspectul frotiului corect; *6* — modul de citire a frotiului



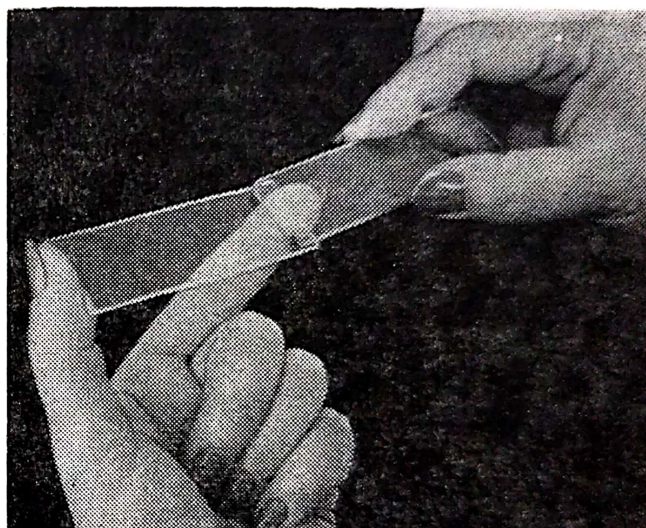
a



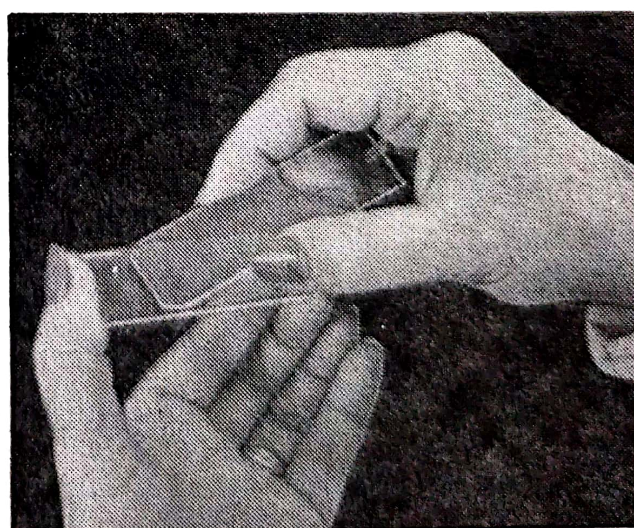
b



c



d



e

Fig. 132 — **Efectuarea frotiului de sînge de la pasăre**

a — dezinfecţia crestei; *b* — secţionarea unui lob al crestei; *c* — luarea unei picături de sînge; *d* — întinderea picăturii pe toată lăţimea lamei şlefuite prin uşoare mişcări de lateralitate; *e* — efectuarea frotiului propriu-zis prin deplasarea în lungul axului longitudinal a lamei şlefuite înclinate

diametru), se aplică rapid pe o lamă degresată care se ține în poziție fixă între degetul mare și arătător (laturile mici ale lamei). După executarea cîtorva mișcări de lateralitate cu scopul de a realiza întinderea picăturii de sînge pe marginea de contact dintre cele două lame, printr-o mișcare de translație uniformă, nu prea rapidă și sub un unghi de cca 45°, se întinde picătura de sînge în lungul lamei degresate, de la dreapta la stînga. Imediat după întinderea sîngelui pe lamă, aceasta se va agita la aer pentru uscarea cît mai rapidă a frotiului. În caz contrar, elementele celulare sanguine se ratatinează.

Un frotiu corect executat trebuie să întrunească următoarele condiții:

— să fie subțire (elementele celulare într-un singur strat, fără a se suprapune sau aglomera pe diferite porțiuni);

— să aibă partea terminală sub formă de semicerc franjurat (ceea ce presupune ca picătura de sînge să se fi terminat de la sine prin întinderea pe lamă, deci convenabilă ca mărime);

— pelicula de sînge să nu acopere în totalitate lama, nici în lungime, nici în lățime;

— să nu existe goluri în pelicula de sînge (existența lor denotă o degresare defectuoasă a lamei pe care s-a întins sîngele);

— să fie uniform (existența unor striațiuni, în care pelicula are grosimi diferite, denotă neuniformitate în deplasarea lamei șlefuite).

Uscarea frotiului va fi urmată de marcarea acestuia cu un creion negru sau cu un corp ascuțit, la baza acestuia, direct pe pelicula de sînge. Această metodă de marcare este cea mai indicată întrucît nu se deteriorează în cursul procesului de colorare și conservare ulterioară.

În afara acestei metode „clasice" de efectuare a frotiurilor, în unele laboratoare se folosesc în locul lamei șlefuite, penițe fine, topografice, perfect degresate; acestea se înmoaie într-o picătură de sînge după care se trasează pe lama degresată o linie subțire, ondulată sau dreaptă, transversală sau longitudinală. Viteza de execuție trebuie astfel potrivită încît linia să iasă de culoarea și transparența unui bun frotiu de sînge, cunoscînd că grosimea frotiului este invers proporțională cu rapiditatea

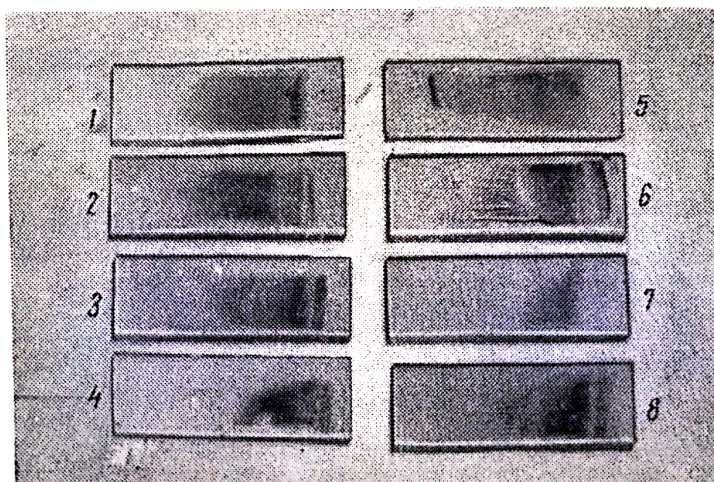


Fig. 133 — Aspectul unor frotiuri
(1 — corect; 2 —8 incorecte)

cu care se trasează linia. Concomitent, se face şi marcarea lamei la una din extremităţi, tot cu ajutorul peniţei înmuiate în sînge.

După autorii care au iniţiat această metodă, distribuţia celulelor în frotiu ar fi mai uniformă decît pe frotiurile efectuate prin metoda clasică.

Aplicînd şi noi, cu titlu experimental, această metodă am constatat că totuşi frotiurile astfel obţinute nu întrunesc avantajele prezentate de cei ce au iniţiat-o.

Colorarea frotiurilor de sînge

Este necesar ca această operaţiune să se facă la cît mai scurt interval (cîteva ore) după efectuarea frotiurilor, avînd în vedere că pe lamele vechi, nefixate, celulele se alterează modificîndu-şi afinităţile tinctoriale. Dacă totuşi acest lucru nu este posibil, ele se vor păstra pînă la colorare, ambalate în hîrtie curată, uscată, sau în cutii speciale cu renuri, ferite de umezeală, şi fără ca suprafeţele pe care se află pelicula de sînge să se atingă între ele.

Metodele şi tehnicile de colorare a frotiurilor de sînge se aleg în funcţie de scopul urmărit.

Metoda panoptică May Grünwald-Giemsa are cea mai largă utilizare în hematologie şi este considerată ca cea mai completă pentru studiile de morfologie celulară sanguină. Pentru ea sînt necesare următoarele materiale:

— plăci Petri cu suporţi de sticlă, lemn, material plastic
— pipete Pasteur
— soluţie May Grünwald
— apă distilată neutră sau apă tamponată
— soluţie Giemsa

Tehnica de colorare. Se aşază frotiurile (cu pelicula de sînge în sus) pe suporţii din interiorul plăcilor Petri, astfel încît să nu se atingă între ele şi nici de pereţii plăcii;

— se acoperă lamele cu un număr cunoscut de picături de soluţie May Grünwald. Se acoperă placa, pentru ca să se împiedice evaporarea alcoolului conţinut de soluţie şi se lasă în contact 3 minute, realizînd în acest fel fixarea frotiului;

— fără a vărsa soluţia May Grünwald de pe lame, se adaugă acelaşi număr de picături de apă distilată neutră sau apă tamponată, lăsîndu-se în contact 1 minut, timp în care este bine ca plăcile să se încline uşor, prin mişcările de balansare, pentru a realiza un bun amestec al apei distilate cu soluţia May Grünwald, care devine astfel hidroalcoolică şi ca urmare colorantă;

— se răstoarnă apoi amestecul de pe lamă şi fără să se spele, se trec frotiurile în baia Giemsa pregătită ex tempore, unde se lasă 20—30 minute (baia Giemsa se prepară în pahare Borel, Berzelius sau băi Laveran, calculînd pentru fiecare 2 ml apă distilată neutră cîte 3 picături de soluţie Giemsa concentrată);

— se scot apoi lamele din baia Giemsa şi se spală sub un jet nu prea puternic de apă de robinet, care în caz contrar ar putea antrena granulaţiile unor leucocite (mai ales ale bazofilelor care sînt mai sensibile). Se şterge dosul lamelor şi se aşază în poziţie înclinată pentru

uscare la temperatura camerei. Frotiurile uscate se pot examina ca atare sau după montarea pe suprafaţa lor, cu ajutorul balsamului de Canada, a unei lamele fine, cu scopul de a se asigura o conservare de mai lungă durată, în condiţii optime, a frotiurilor (se va avea grijă ca între lamă şi lamelă să nu se formeze bule de aer).

Rezultatele colorării panoptice: frotiul bine colorat are un aspect slab violaceu.

Examinate la microscop, hematiile au o culoare cărămizie, nucleii sînt de culoare violacee, nucleolii albastru-palid, granulaţiile eozinofile sînt portocalii, cele ale bazofilelor albastru-negru, cele ale neutrofilelor maron-închis iar granulaţiile azurofile de nuanţă roşie-purpurie.

În situaţia în care frotiul are o culoare albastră înseamnă că acesta a fost supracolorat, sau a avut o grosime excesivă. Ea se poate datora şi unei insuficiente spălări după colorare.

Culoarea roşie a frotiurilor denotă fie o spălare prelungită, fie o colorare insuficientă, fie aciditatea coloranţilor sau a diluantului.

Apariţia precipitatelor pe frotiu se poate datora spălării insuficiente, uscării frotiului în timpul colorării sau sedimentării colorantului (trebuie filtrat).

Frotiurile supracolorate se pot decolora cu alcool metilic p.a. timp de cîteva minute (se urmăreşte virarea culorii frotiului), în timp ce insuficienta colorare poate fi remediată prin recolorarea cu soluţie Giemsa diluată, pînă se obţine culoarea corespunzătoare.

Metoda Giemsa rapidă foloseşte un amestec format din o parte colorant Giemsa cu 2 părţi alcool metilic absolut (este esenţial ca alcoolul metilic să fie de bună calitate). Practic, pentru un frotiu se amestecă într-o eprubetă uscată 10 picături de colorant Giemsa cu 20 picături alcool metilic şi se acoperă frotiul cu întreaga cantitate din acest amestec, timp de 30 secunde;

— se adaugă un volum egal de apă distilată neutră, se omogenizează amestecul cu o pipetă Pasteur şi se lasă în contact 2 minute;

— se aruncă soluţia colorantă de pe lamă şi se acoperă frotiul cu apă distilată neutră, lăsîndu-se astfel 30 de secunde;

— se lasă lamele să se usuce şi se examinează.

Timpul de colorare este de 3 minute, iar rezultatele colorării sînt la fel de bune ca în metodele panoptice clasice.

Colorarea bazofilelor. Pentru colorarea granulocitelor bazofile se procedează la următoarea tehnică de colorare a frotiurilor:

— fixare şi colorare concomitentă, timp de 5 minute cu soluţie de albastru de toluidină 1% în alcool metilic;

— spălare cu apă de robinet şi uscare la aer.

Granulele bazofilelor apar colorate metacromatic în roşu-violet, restul celulelor fiind colorate în albastru-deschis. Granulaţiile toxice din neutrofile, cele ale promielocitelor, monoblaştilor şi trombocitelor apar colorate tot metacromatic dar mult mai slab, încît nu se pot confunda.

Coloraţia vitală cu albastru de crezil pentru reticulocite. Se folosesc în acest scop două soluţii:

Soluţia 1:

— Oxalat de sodiu	1,0 g
— Ser fiziologic	100,0 ml

Soluţia 2:
— Albastru de crezil 1,0 g
— Ser fiziologic 100,0 ml

Tehnica de colorare. Într-o eprubetă mică (de seroreacţie) se pun în următoarea ordine:

— soluţia 1 — 12 picături
— soluţia 2 — 3 picături
— sînge — 3—4 picături

Se lasă în repaus 2 ore, timp în care eritrocitele sedimentează. Se ia apoi cu o pipetă Pasteur din sediment o cantitate oarecare din care se efectuează frotiuri obişnuite. Se pot supracolora prin metoda panoptică May Grünwald-Giemsa.

Rezultatul colorării: pe fondul gălbui al eritrocitelor necolorate (sau de culoare roz dacă eritrocitele sînt colorate), apare substanţa granulo-reticulo-filamentoasă colorată în albastru intens, caracteristică reticulocitelor.

Colorarea corpilor eritrocitari. Corpii eritrocitari care apar în unele anemii hemolitice cu methemoglobinemie şi sulfhemoglobinemie, se evidenţiază prin aceeaşi coloraţie ca pentru reticulocite, folosind însă o soluţie de sulfat de albastru de Nil 0,5% în alcool absolut. Ei apar coloraţi în albastru-închis, iar eritrocitele în galben-verzui.

Evidenţierea peroxidazelor pentru seria granulocitară. Colorarea peroxidazelor se foloseşte pentru diferenţierea leucemiei granulocitare de alte tipuri de leucemie, cînd celulele sînt relativ nediferenţiate. Se pot folosi în acest scop următoarele metode:

Metoda I. Sînt necesare două soluţii:

Soluţia A: 0,5% sulfat de cupru în apă distilată

Soluţia B: soluţie saturată de benzidină bază CP (aceasta se obţine prin mojararea a 0,2 g benzidină împreună cu cîteva picături de apă distilată, urmată de completarea cu apă distilată pînă la volumul de 200 ml. Se filtrează şi se adaugă 4 picături de soluţie 3% de peroxid de hidrogen. Soluţia poate fi păstrată la întuneric sau într-o sticlă brună). Este necesar să se verifice eficacitatea acestor soluţii; amestecînd soluţie A cu soluţie B trebuie să apară o culoare albastră. În caz contrar, se verifică soluţia B care nefiind saturată determină deficienţa semnalată.

Tehnica de colorare. Se acoperă frotiul pentru 30 de secunde cu soluţie A

— Se spală uşor şi se transferă în soluţie B pentru 2 minute
— Se spală cu grijă şi se diferenţiază cu soluţie apoasă de safranină 1% timp de 2 minute
— Spălare, uscare la aer şi eventual montare.

Rezultat: acţiunea de oxidare a benzidinei asupra sistemului peroxid-peroxidaze rezultă din producerea unor granule intracelulare de culoare albastră-verzuie sau brună în neutrofile şi eozinofile. Monocitele pot prezenta ocazional cîteva granule de peroxidaze. Limfocitele, eritrocitele, plasmocitele, trombocitele, celulele sistemului reticulo-histiocitar nu conţin peroxidaze. Este totuşi posibil ca uneori celulele reticulo-histiocitare să dea slabe reacţii pozitive, acest lucru întîmplîndu-se în situaţiile în care ele au fagocitat elemente mieloide.

Metoda Graham-Knoll pentru peroxidaze necesită următorii reactivi:

— soluţie alcoolică de formol 10% (10 părţi formol 40% + 90 părţi alcool 96°)

— soluţie de benzidină (se dizolvă 30—50 mg benzidină gălbuie în 6 ml alcool 96° diluat cu 40 ml apă distilată, la care se adaugă 0,2 ml apă oxigenată; soluţia se poate conserva 5 zile în sticle cu dop rodat)

— Soluţie Giemsa (10 picături sol. Giemsa concentrată la 15 ml apă distilată neutră).

Tehnica de lucru. Frotiurile (care nu trebuie să fie mai vechi de 2 zile) se fixează timp de 30 secunde (strict) în soluţia alcoolică de formol.

— Se varsă formolul de pe lamă şi se acoperă frotiurile cu soluţie de benzidină, lăsîndu-se în contact 5 minute.

— Se spală temeinic cu apă de robinet şi se usucă.

— Se introduc în soluţie Giemsa diluată unde se ţin 1—2 ore.

Rezultatul:

Granulaţiile de peroxidaze sînt galbene-verzui, cu nuanţe de brun, de diferite intensităţi.

Metoda este utilă pentru diferenţierea celulelor de origină limfatică, care sînt peroxidazo-negative, de cele de origină medulară, peroxidazo-pozitive.

Evidenţierea peroxidazelor în eozinofile se poate obţine prin colorarea frotiurilor prin metoda May Grünwald-Giemsa, cu menţiunea că soluţiei Giemsa diluată trebuie să i se adauge soluţie de benzidină diluată în proporţie de 1 ml sol. benzidină diluată la 10 ml soluţie Giemsa diluată.

Prin această metodă nu pot fi puse în evidenţă peroxidazele în nici un alt tip de celule decît în eozinofile.

Reacţia pentru oxidaze, ca şi cea a peroxidazelor, serveşte la diferenţierea elementelor mieloice de cele limfocitare, în special în cazurile de leucoză cînd singur examenul morfologic al sîngelui nu permite stabilirea tipului de leucoză (limfoidă sau mieloblastică).

Metoda se bazează pe sinteza albastrului de indofenol în prezenţa oxidazelor.

Reactivi: amestec fixator (amestec în părţi egale de formol 40% cu alcool absolut).

— Soluţia 1:

— alfa-naftol	1,0 g
— NaOH N/10	1,0 ml
— Ser fiziologic	100,0 ml

— Soluţia 2:

— paradimetil-parafenilen-diamină (bază)	1,0 g
— ser fiziologic	100,0 ml

Soluţia 1 se prepară în felul următor:

se fierbe serul fiziologic şi se adaugă în timpul fierberii 1,0 g alfa-naftol şi 1 ml NaOH N/10 picătură cu picătură. După răcire se filtrează, soluţia putînd fi păstrată timp de 4 săptămîni la întuneric.

Tehnica de lucru. Se introduc frotiurile în amestecul fixator, se lasă 2 ore.

— Se transferă apoi lamele în soluţia colorantă de lucru (aceasta se obţine amestecînd 1 volum soluţie 1 cu 4 volume soluţie 2) filtrată, în care se lasă timp de 3 minute.

— Se spală cu apă şi se usucă.

— Se introduc apoi în safranină 1% pentru 1—3 minute, în scopul colorării nucleilor.

Rezultatele acestei reacţii sînt aceleaşi cu ale peroxidazelor.

La interpretarea frotiurilor se va ţine seamă de faptul că paramieloblaştii dau inconstant reacţie peroxidazică pozitivă; ca urmare o reacţie negativă nu poate exclude prezenţa paramieloblaştilor. În schimb, reacţia pozitivă exclude prezenţa seriei limfocitare.

Reacţia pentru fosfataza alcalină este utilă pentru diferenţierea leucozei mieloide cronice de reacţiile leucemoide privind seria granulocitară.

Activitatea fosfatazei alcaline poate fi pusă în evidenţă numai în citoplasma granulocitelor neutrofile segmentate (care în mod normal au o activitate fosfatazică alcalină slabă). Monocitele, limfocitele, eozinofilele, plasmocitele şi celulele tinere, blastice, nu prezintă activitate fosfatazică alcalină.

În reacţiile leucemoide privind seria granulocitară (infecţii acute, infecţia tuberculoasă, carcinomatoza, anemii hemolitice, policitemie adevărată, mieloscleroză) activitatea fosfatazei alcaline este mult intensificată.

În leucoza mieloidă activitatea fostafatazei alcaline este slabă sau lipseşte total; nu apar celule cu reacţii intens pozitive.

Tehnica de lucru. Se fixează frotiurile timp de 30 secunde într-un amestec format din 10 ml formol şi 90 ml alcool metilic absolut.

— Se spală cîteva secunde.

— Se incubează timp de 2 ore la 37°C într-o soluţie preparată ex tempore din:

— Veronal sodic 10%	30,0 ml
— Beta-glicerofosfat de sodiu 3%	30,0 ml
— Sulfat de magneziu M/10	30,0 ml
— Nitrat de calciu 2%	45,0 ml
— Apă distilată	165,0 ml

— Spălare cu apă distilată în care s-au pus cîteva picături de soluţie de nitrat de calciu 2%, timp de cîteva secunde.

— Imersarea lamelor într-o soluţie 2% de nitrat de cobalt, timp de 5 minute.

— Spălare temeinică, după care se acoperă frotiurile cu o soluţie slabă de sulfură de amoniu (1 ml sulfură de amoniu la 80 ml apă), lăsîndu-se în contact 10 secunde.

— Se spală bine lamele.

— Se colorează cu soluţie apoasă de safranină 2% timp de 10 secunde.

— Se spală temeinic şi se usucă la aer.

Prezenţa activităţii fosfatazei alcaline este indicată de prezenţa unor precipitate negre-verzui în citoplasma granulocitelor neutrofile segmentate.

Reacţia PAS pentru glicogen este utilă pentru diferenţierea limfoblastului din leucoza acută (prezintă reacţie PAS intens pozitivă) de mie-

loblast care are o reacţie foarte discretă (citoplasma roz-difuză palid, fără granulaţii).

Materiale necesare:

— formol

— soluţie de acid periodic 1% în apă distilată (poate fi conservată timp de 1 lună)

— reactiv Schiff (acid fucsin-sulfuros) care se prepară astfel: în 200 ml apă distilată la fierbere, se dizolvă 1 g de fucsină bazică fin pulverizată, agitînd continuu. Se răceşte pînă la temperatura de 50°C, se filtrează şi se adaugă 20 ml acid clorhidric normal; cînd soluţia este răcită la 25°C se adaugă 1 g de sulfit acid de sodiu (bisulfit de sodiu) anhidru (SO_3HNa p.a.). Se lasă soluţia la temperatura camerei, la întuneric, timp de 24 ore, după care se adaugă 2 g de cărbune activ, agitînd amestecul timp de 1 minut. Se filtrează imediat şi se păstrează ermetic închisă, la întuneric, la 4°C. Soluţia trebuie să fie incoloră sau cu o tentă gălbuie foarte discretă. Cînd soluţia devine roşie nu mai poate fi utilizată. Pentru a putea fi folosită, soluţia se lasă să se încălzească la temperatura camerei;

— apă sulfuroasă pentru spălare, preparată ex tempore din:

— sulfit acid de sodiu 10%	10,0 ml
— acid clorhidric N	10,0 ml
— apă distilată	200,0 ml

— soluţie 1% de verde-lumină sau hematoxilină soluţie apoasă 1%.

Tehnica de lucru. Se fixează frotiurile prin vapori de formol, timp de 5—10 minute.

— Spălare abundentă cu apă distilată.

— Tratare cu soluţie de acid periodic timp de 7—10 minute.

— Spălare cu apă distilată.

— Se trec apoi frotiurile în reactivul Schiff, lăsîndu-le astfel 20—30 minute, la întuneric.

— Spălare în apa sulfuroasă, cîte 2—3 minute, de 3—4 ori, schimbînd soluţia după fiecare spălare.

— Spălare cu apă de robinet, sub jet, timp de 10 minute.

— Uscarea frotiurilor.

Se poate folosi pentru colorarea fondului soluţia de verde-lumină sau hematoxilină (sol. apoasă 1%).

Întrucît prin reacţia PAS se colorează nu numai glicogenul ci şi mucoproteinele, cerebrozidele, fibrina, mucina, este necesar ca reacţia să fie verificată cu un martor al cărui glicogen a fost digerat cu salivă (lama fixată şi uscată se va acoperi cu salivă centrifugată, lăsîndu-se astfel timp de 60 minute la temperatura camerei, după care se spală şi se colorează după tehnica expusă).

Rezultatul: glicogenul apare sub forma unor granulaţii roşii în citoplasmă.

Limfocitele şi monocitele dau o reacţie slab pozitivă, cu granulaţii rare, fine. Trombocitele şi megacariocitele au o reacţie mai intens pozitivă.

Limfoblastul în leucoza acută prezintă o reacţie PAS intens pozitivă, prezentînd numeroase granulaţii roşii în citoplasmă, ceea ce îl diferenţiază de mieloblast la care reacţia PAS este slabă, citoplasma fiind de culoare roz-palid, difuză, fără granulaţii.

Evidenţierea siderocitelor pe frotiuri de sînge

Punerea în evidenţă a siderocitelor pe frotiurile de sînge este utilă pentru diagnosticul diferenţial al anemiilor feriprive faţă de alte anemii sideremice. În corelaţie cu datele clinice, acest test poate fi utilizat ca mijloc de diagnostic în anemia infecţioasă a calului.

Tehnica de lucru. Frotiurile se colorează mai întîi panoptic (May Grünwald Giemsa), se usucă şi se acoperă apoi lamele cu următoarea soluţie preparată ex tempore:

— Ferocianură de potasiu	1,0 g
— Acid clorhidric 37% purissim	1,0 ml
— Apă bidistilată	100,0 ml

Cu această soluţie lamele rămîn în contact timp de 4—5 minute.

Se spală apoi cu apă distilată, se usucă şi se examinează.

În funcţie de celula examinată, granulele de fier apar în număr variabil, fiind de dimensiuni mici şi de culoare albastră.

Această metodă are avantajul că permite şi diferenţierea morfologică a elementelor celulare sanguine.

Valoarea frotiului de sînge

Studiul sistematic al frotiului de sînge pune la dispoziţia medicului specialist multiple şi valoroase date, pe care nici un alt test hematologic nu le poate furniza, cu condiţia ca acesta să fie complet şi efectuat de către un expert în probleme de hematologie.

Examinarea frotiului de sînge colorat trebuie să se facă cu multă atenţie, apreciindu-se nu numai aspectul microscopic ci şi cel macroscopic.

Prin examenul macroscopic se apreciază:

— calitatea frotiului: subţire, cu marginile paralele şi terminat pe lamă cu franjuri, presărat cu zone mici rotunde necolorate (lamă nedegresată sau sînge medular), uniform etc.;

— culoarea frotiului: slab violacee, omogenă, albastră sau roz, neomogenă (zone palide alternînd cu zone intens colorate).

Examenul microscopic se începe cu un obiectiv uscat, apreciindu-se:

— celularitatea (numărul de celule nucleate)

— distribuţia celulelor

— prezenţa de celule anormale

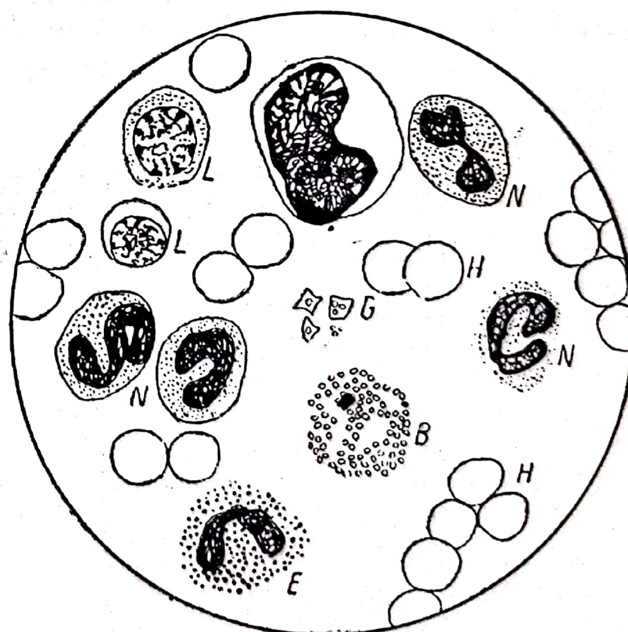


Fig. 134 — **Principalele elemente figurate ale sîngelui la mamifere**

H — hematii; *L* — limfocite de talie diferită; *N* — neutrofile; *E* — eozinofil; *B* — bazofil; *G* — plachete sanguine; *M* — monocit

— alegerea zonei pentru examenul cu imersie care se face în următoarea etapă şi care include:

a) Cercetarea eritrocitelor

— mărimea (macrocitoză, microcitoză, anizocitoză, normocitoză)

— forma (poikilocitoză, sferocitoză, celule falciforme, celule „în ţintă", ovalocitoză)

— culoarea (normocromic, hipocromic, hipercromic)

— forme anormale (policromatofilie, eritrocite cu punctaţii bazofile, inele Cabot, corpi Howell-Jolly, formare de rulouri, eritrocite parazitate, eritroblaşti)

b) Cercetarea leucocitelor

— Raportul procentual al diferitelor tipuri de leucocite (formula leucocitară).

În acest scop se va proceda la examinarea frotiului după o anumită conduită şi anume parcurgînd în zig-zag cele două margini, deplasarea făcîndu-se într-o singură direcţie.

Se înregistrează într-un tabel fiecare leucocit întîlnit, în dreptul simbolului celulei respective. Pentru a reduce cît mai mult erorile, este obligatoriu să se numere cel puţin 200 de leucocite.

Înregistrarea procentului diferitelor tipuri de leucocite precum şi a numărului total de elemente albe pe care s-a făcut formula leucocitară, se poate face cu ajutorul unor „contoare" mecanice sau electronice, foarte comod de manipulat de către examinator.

Leucocitele anormale (care se vor descrie în detaliu), se includ în numărul total de leucocite.

Celulele fragmentate sau degenerate, neputînd fi identificate, nu se includ în numărătoare: ele se notează separat şi se exprimă procentual, ca şi celulele altor serii (eritroblaşti, celule reticulare ş.a.).

Este indicat ca rezultatul final să reprezinte media leucocitelor de pe două frotiuri „pereche", executate din aceeaşi picătură de sînge.

Rezultatele formulei leucocitare trebuie să fie corelate cu numărul total de leucocite stabilit prin hemocitometrie.

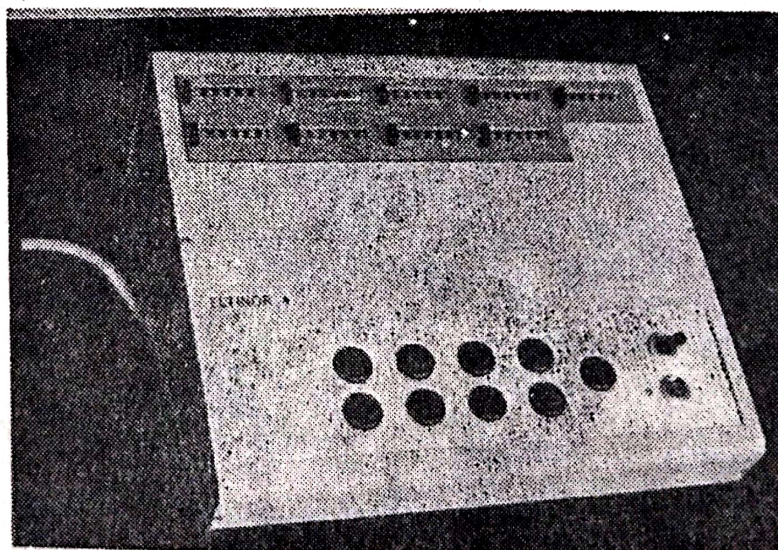


Fig. 135 — Contor electric pentru numărători de elemente figurate sanguine

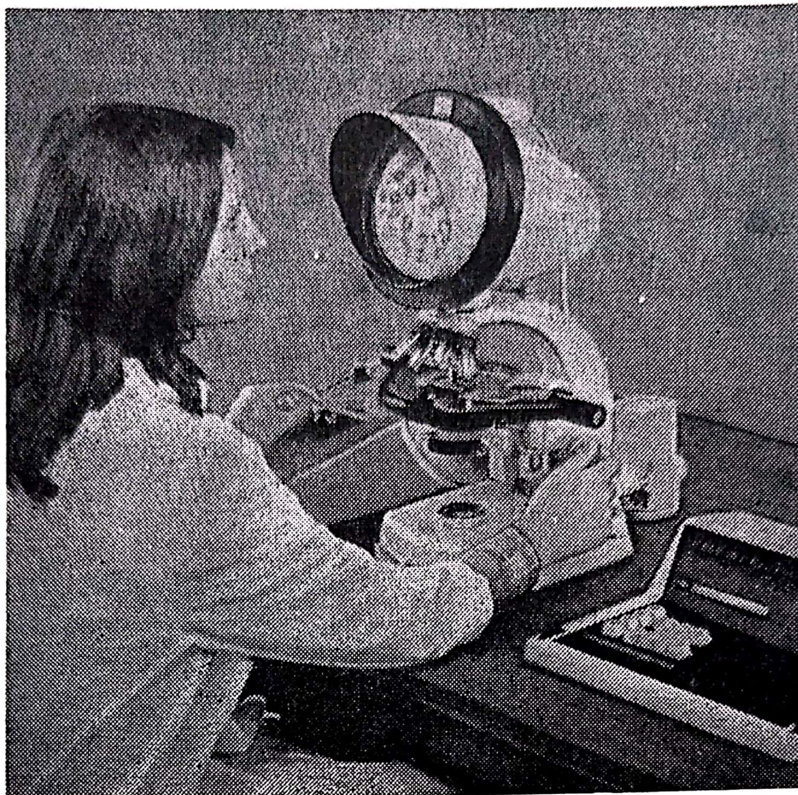


Fig. 136 — Efectuarea formulei leucocitare și examenul morfologic al sîngelui cu ajutorul microscopului cu ecran de proecție

Criteriile de identificare a fiecărui tip de celule sînt:

— dimensiunile celulei;

— nucleul: poziție, formă, culoare, structură cromatiniană, membrana nucleară, prezența sau absența nucleolilor;

— citoplasma: cantitatea relativă (raportul nucleo-citoplasmatic), culoarea, prezența sau absența haloului perinuclear, granulații (mărime, culoare, număr, distribuție).

Erori ale formulei leucocitare:

— mecanice (de recoltare, executare și colorare a frotiului, de repartiție neomogenă a celulelor pe frotiu — de obicei celulele mari se distribuie pe marginile frotiului, iar celelalte spre centrul acestuia);

— de eșantionaj (nu poate fi exclusă dar poate fi redusă dacă se numără cît mai multe celule — 200 și peste);

— de interpretare (depinde de competența examinatorului).

Anomalii morfologice. Granulocite: gigante și cu mai mulți lobi — macropolicite; hipersegmentare — pleiocariocite; cu corpi Döhle — zone bazofile în citoplasmă; cu granulații toxice; hipogranulare; cu carioschize — mici pedunculi ai nucleului; granulocite cu anomalii ereditare calitative nucleare (lipsa de segmentare și picnoza nucleului, hipersegmentarea); anomalii ereditare citoplasmatice (prezența de granulații azurofile mari în granulocite, limfocite și monocite, vacuole pline cu granulații azurofile mari, prezența de corpi Döhle); anomalii ereditare cantitative (eozinofilia familială, neutropenia constituțională).

Identificarea anomaliilor morfologice este de mare importanţă pentru diagnostic; ea depinde foarte mult de calităţile frotiului care trebuie să fie ireproşabile.

Celulele anormale care nu se pot identifica se înregistrează ca „celule atipice“ şi ele trebuie să fie descrise amănunţit pe buletinul de analiză.

c) Cercetarea trombocitelor pe frotiul de sînge

— numărul se apreciază după aceleaşi reguli ca şi în cazul leucocitelor; numărătoarea trombocitelor pe frotiul de sînge trebuie controlată cu numărarea directă a acestora în hemocitometru.

— anomalii morfologice (anizocitoză trombocitară, prezenţa de micro-, macro- şi megalotrombocite, modificări ale granulomerului).

— aglutinabilitatea se apreciază calitativ şi cantitativ, numărîndu-se cîte grupuri de trombocite se găsesc la 100 de trombocite izolate.

Morfogenie şi tinctorialitate celulară

Pentru o interpretare corespunzătoare a frotiului de sînge sau de măduvă osoasă (prin examen microscopic) trebuie să se aibă în vedere, pe lîngă criteriile menţionate, şi următoarele aspecte de morfologie şi tinctorialitate celulară:

— *celulele nediferenţiate,* foarte tinere (aşa-numitele celule „blastice“: eritroblaşti, plasmoblaşti, mieloblaşti etc.), se caracterizează prin:

— nucleu voluminos, conţinînd nucleoli

— protoplasmă abundentă

Cu cît celula este mai tînără, reţeaua de bazicromatină este mai fină, se colorează mai metacromatic, violet către roşcat.

Nucleolii sînt cu atît mai voluminoşi, cu cît activitatea lor este mai mare, colorîndu-se în albastru ortocromatic.

Protoplasma „blaştilor“, bogată în ARN (mesager, ribozomial, de transfer), se colorează în albastru ortocromatic, intensitatea culorii fiind direct proporţională cu densitatea ARN-ului. Fusul nuclear se colorează metacromatic bordo-violaceu cu azurul de metilen.

Capacitatea mitotică este cu atît mai mare cu cît celula este mai tînără;

— *celula matură,* funcţională (poartă sufixul de „cit“: eritrocit, granulocit, plasmocit etc.) are raportul nucleo-plasmatic inversat. Nucleolii dispar.

Cromatina nucleară este mai densă, metacromatic violet-închis.

Dispare ortobazofilia citoplasmei; apar însă organite specifice: granulaţii funcţionale specifice şi aparatul enzimatic celular (se pune în evidenţă prin tehnici speciale de enzimocitologie);

— *formele de tranziţie* între „blast“ şi „cit“, poartă prefixul „pro“ (promielocit, proplasmocit etc.); morfologic şi tinctorial prezintă caractere intermediare.

Bazicromatina este mai densă.

Nucleolii sînt pe cale de dispariţie.

Protoplasma mai puţin ortocromatic bazofilă.

Granulaţiile tinere au o tentă albăstruie, alături de afinitatea tinctorială specifică.

Pentru medicul veterinar clinician, în sarcinile căruia ar trebui să intre şi diagnosticul hematologic, dificultăţile sînt mult mai mari decît pentru medicul uman, avînd în vedere diversitatea speciilor de animale cu care operează.

În funcţie de specie, vîrstă şi uneori şi de alţi factori, elementele figurate ale sîngelui prezintă anumite particularităţi morfologice, dintre care cele mai importante sînt redate în cele ce urmează.

La cabaline. Elementele roşii au dimensiuni cuprinse între 4—7,5 microni (majoritatea lor au diametrul de 4,5—5,5 microni), fiind în general uniforme, lipsite de punctare bazofilă; ocazional se pot găsi corpusculi Jolly. Forme imature nu se găsesc în mod normal aproape niciodată în sîngele periferic.

Tabloul leucocitar este caracterizat de predominenţa neutrofilelor.

Neutrofilul are cromatina neuniformă iar membrana apare zimţată, dînd impresia de multilobulaţie. Cu toate că pot fi observate filamente, ele sînt în general rare. Din cauza condensării cromatice de la marginea nucleară, aceasta apare la neutrofilul tînăr mai neregulată la cal decît la celelalte specii. În comparaţie cu neutrofilul matur, nucleul formelor tinere este mai voluminos, mai puţin boselat şi de obicei nu este încolăcit.

Citoplasma are în mod normal granule foarte fine, pulverulente, de culoare roz.

În condiţii de toxiemie, citoplasma nu-şi continuă procesul de maturare şi apare uşor albăstruie, conţinînd uneori granulaţii toxice. Semne de toxiemie apar şi în bolile însoţite de depresiunea granulopoezei şi în tulburări gastrointestinale grave. În asemenea cazuri, este posibilă apariţia de metamielocite. Aşa spre exemplu, în salmoneloza acută, alături de leucopenie apar şi neutrofile imature, de dimensiuni mai mari, cu nucleul tumefiat, cu spaţii paracromatice mai abundente, dînd nucleului o nuanţă roşiatică, în timp ce citoplasma are o coloraţie mai bazofilă.

Eozinofilul se deosebeşte de eozinofilul altor specii, datorită granulelor sale foarte mari (2—3 microni) care umplu aproape în întregime citoplasma. Conturul celular urmează conturul granulelor care, fiind de dimensiuni mari, imprimă un aspect muriform celulei. Granulele sînt de culoare roşie-orange intensă şi frecvent sînt atît de numeroase încît maschează parţial nucleul.

Citoplasma, de culoare albastru-pal, se poate observa numai în spaţiile dintre granule şi la periferia celulei.

Bazofilul are granulaţii brune-închise, neregulate ca mărime şi formă, putînd fi tasate sau dispersate în citoplasmă, uneori şi peste nucleu.

Limfocitul. Majoritatea limfocitelor sînt mici, cu nucleu intens colorat şi citoplasmă redusă. Limfocitele, care ating dimensiunile monocitelor, au o cromatină nucleară omogenă şi o cantitate importantă de citoplasmă, de asemenea omogenă, albastră-deschisă. Granulele azurofile pot fi găsite uneori în citoplasma limfocitelor; ele sînt mici, de formă neregulată.

Monocitul are citoplasma albastră-cenuşie, granulară, presărată cu granule azurofile şi mici vacuole uneori. Forma cea mai caracteristică

a nucleului este cea reniformă, cu poziţie excentrică. Cromatina apare dantelată şi fibrilară, dar poate fi şi conglomerată.

Trombocitele. Dintre speciile de animale domestice, calul are cel mai mic număr de trombocite. Ele apar colorate pal, cu citoplasma albastră-deschisă, conţinînd granule azurofile fine. Ele variază, ca formă, de la cea ovală la forme alungite, uneori putînd fi întîlnite şi forme gigante, de dimensiunile eritrocitelor.

La bovine. Hematiile sînt în general normocite, cu valori limite de la 4,4—7,7 microni. Pot fi întîlnite adesea şi forme gigante de elemente roşii, (megalocite), poikilocite, cu policromazie, punctare bazofilă, corpusculi Jolly.

Tabloul leucocitar este predominat de limfocite.

Neutrofilele sînt relativ mari (10—15 microni), nucleul lor prezentînd de cele mai multe ori un lob separat de segmentul principal printr-un filament fin. Citoplasma conţine numeroase granule pulverulente, distincte.

Neutrofile imature nu apar în mod normal în mai mult de 1—2% din cazuri. Nucleul acestora este mult mai voluminos, iar citoplasma neomogenă.

În fazele iniţiale ale proceselor inflamatorii acute (peritonite, pericardite, mastite acute) în circulaţia periferică vor apare neutrofile imature. În stări toxiemice, apar metamielociţi cu citoplasma bazofilă şi neutrofile imature, cu citoplasma vacuolată. Dacă granulele sînt mari şi mai puţine numeric, se apreciază că granulaţia este toxică. Tot în aceste stări, în neutrofilele mature pot apărea granulaţii roşii de dimensiuni mari, pe lîngă granulaţiile uniforme, pulverulente, specifice.

În bolile supurative acute, cînd toxiemia este atît de severă încît granulopoeza este inhibată, pot apărea forme precursoare, puternic vacuolate, forme gigante cu nucleu şi citoplasmă bazofilă conţinînd granule toxice.

Eozinofilul are mărimea medie de 12—14 microni. Se recunoaşte prin granulele numeroase de dimensiuni reduse, rotunde, uniforme, de culoare roşie-portocalie, care umplu aproape întreaga citoplasmă.

Citoplasma are o culoare albastră-deschisă, iar nucleul poate fi parţial acoperit de granule, dar nu complet mascat. El poate fi bilobat, dar de cele mai multe ori este compact.

Bazofilul variază ca mărime între 10—12 microni, avînd o structură densă, intens colorată, din cauza nucleului care este contractat şi acoperit de granulele albastre-închise pînă la negru. Pentru acest motiv forma nucleului nu este uşor de recunoscut. Apare rar în sîngele periferic.

Limfocitul este cel mai important element alb din sîngele bovinelor, predominînd numeric, (59—70%). Dimensiunile variază între 8—15 microni diametru; formele mari au fost numite celule de tranziţie, putînd fi confundate chiar cu monocitele. În caz de dubiu, decizia trebuie să fie luată în favoarea limfocitului.

Limfocitul mic are un nucleu rotund, dens, intens colorat, care ocupă aproape întreaga celulă, încît citoplasma este de cele mai multe ori aproape invizibilă.

Limfocitul mijlociu are nucleul mai puţin intens colorat, cu cromatina neuniformă; el este rotund dar poate avea o uşoară escavaţie a

membranei nucleare. Citoplasma este reprezentată de o bandă subţire, limitată la una din părţi, dar poate să înconjoare şi complet nucleul. Ea are o culoare albastră-deschisă, uneori putînd fi neuniform colorată.

Limfocitul mare are un nucleu mai puţin intens colorat, cu o reţea de cromatină neuniformă, cu contur rotund, situat de obicei excentric, uneori cu aspect reniform.

Forme mai tardive, denumite celule Rieder, pot fi văzute în leucoza limfoidă. Citoplasma este în acest caz albastră-pală, înconjurînd complet nucleul (în formă de treflă), prezentînd ocazional vacuole mici, rotunde.

Relativ frecvent dar nu constant, se pot observa în celule granulaţii azurofile, variabile ca dimensiuni, forme şi număr, de culori variind de la roşiatic la albăstrui.

La bovine, au mai fost descrise şi limfocite de culoare albastră-închisă, denumite celule Türck. Numărul unor asemenea celule poate fi crescut în bolile toxiemice.

Monocitul are dimensiuni variabile între 13—20 microni. Nucleul este variabil ca formă, de la rotund la încurbat, ultimul aspect fiind cel mai frecvent. Cromatina este de obicei difuză şi apare fibrilară, dar poate prezenta şi zone mai închise, asemănătoare cu cele din limfocite. Citoplasma tinde să fie mai deschisă decît a limfocitelor şi este mai granulară. Frecvent, apar vacuole, mai puţin regulate şi numeroase decît în limfocite. Granule azurofile veritabile nu sînt prezente în mod obişnuit.

Monocitele nu sînt numeroase în sîngele normal bovin, dar ele tind să dispară în cursul fazelor acute de boală, în timp ce în procesele inflamatorii numărul lor creşte.

Trombocitele au de obicei dimensiuni reduse, putînd însă apărea şi forme gigante. În general, ele apar în grămezi mai mult sau mai puţin numeroase. Pachete izolate pot să se suprapună eritrocitelor. Aspectul lor obişnuit este acela de granule roşii-purpurii, înconjurate de citoplasmă albastră, cu membrană fină.

La ovine. Hematiile sînt în general rotunde, cu dimensiuni cuprinse între 2,5—7 microni. Ele prezintă un uşor grad de anizocitoză. Policromazia este foarte rară, ceva mai frecvent apărînd corpusculi Jolly. Rareori, se găsesc reticulocite.

Tabloul leucocitar are un caracter limfocitar.

Neutrofilul are nucleu de obicei multilobat, cu cromatina fragmentată şi filamente scurte. Citoplasma este slab colorată iar granulaţia este fină, pulverulentă, difuză. Adesea, apar granule de dimensiuni mai mari şi mai slab colorate, pe fondul obişnuit al citoplasmei.

Neutrofilul tînăr are nucleul voluminos, în formă de „U“ sau cu prelungiri în formă de „S“. Citoplasma este mai albastră şi mai puţin granulară. Este probabil ca bazofilia citoplasmei să fie expresia maturării incomplete în cazul bolilor toxice.

Eozinofilul are granule uniforme ca mărime, ovoide, de culoare roşie-oranj. Citoplasma este intens încărcată cu granule. Adesea, apare un strat subţire de citoplasmă albastră la marginea celulei.

Bazofilul prezintă un număr variabil de granule cu un halo roşiatic, contrastînd evident cu nucleul intens colorat. Membrana celulei poate fi neregulată.

Limfocitul are dimensiuni variabile dar împărţirea în limfocite mari şi mici este mai dificilă decît la bovine.

Limfocitele mari nu dispun de particularităţi, ceea ce face ca ele să fie uşor de confundat cu monocitele. Nucleul tuturor formelor are o cromatină uniformă şi ocazional colorată uşor în roşiatic. Marginile nucleare sînt netede, cu contur rotund sau oval. Citoplasma este albastră distinct şi înconjoară în totalitate nucleul. Se poate observa adesea un halo perinuclear. De asemenea pot apărea uneori granule azurofile, variabile ca număr şi dimensiuni.

Monocitul are un nucleu relativ intens colorat, de formă obişnuit ameoboidală, fiind trilobat. Citoplasma este albastră-cenuşie, cu o textură granulară. Colorabilitatea este mai intensă decît a limfocitului mare.

Trombocitele apar în grămezi, sînt purpurii pale, înconjurate de o membrană fină care nu este întotdeauna vizibilă. Au adesea tendinţa de a se contopi în mase de dimensiuni variabile.

La porc. Sîngele de porc conţine în mod normal forme inelare şi rari normoblaşti şi hematii policromatice. La purcei, pot apărea în proporţie de 1—13% celule vital granulate. De menţionat că la această specie se produc foarte rapid deformări ale hematiilor.

Tabloul leucocitar la porc prezintă o predominanţă a neutrofilelor a căror reprezentare este de 32—78,7%.

Neutrofilele au cromatina nucleară intens colorată, nucleul fiind adesea încolăcit, cu margini neregulate. Citoplasma are o culoare albastră-deschisă şi este plină cu granule pulverulente de culoare roz ceea ce face ca adesea culoarea în ansamblu a citoplasmei să apară roz, după cantitatea de granule pe care o conţine.

În cazul recoltării sîngelui pe oxalat, în citoplasma acestor celule se pot observa cristale de oxalat.

În prima zi postpartum pot apărea în circulaţia periferică metamielocite cu nucleu voluminos, cromatina neuniformă, membrana nucleară netedă, iar citoplasma de culoare albastră-pal.

Eozinofilul are granule rotunde sau ovoide, colorate în portocaliu-deschis, umplînd complet citoplasma, adesea cu cîteva granule şi peste nucleu. În fazele iniţiale, nucleul poate fi reniform.

Bazofilul are nucleul de culoare albastră-violacee, cu cromatina netedă. Granulele pot lua aceeaşi coloraţie cu a nucleului sau pot fi mai închise. Ele sînt limitate de obicei la citoplasmă, rareori cîteva granule putînd apărea şi peste nucleu. Forma granulelor este sferică sau uşor ovală.

Limfocitul. Nucleul limfocitului mic este de dimensiuni mari, reprezentînd aproape întreaga celulă, citoplasma fiind redusă la un strat foarte subţire, pe una din laturi sau poate constitui un inel subţire în jurul nucleului. Forma nucleului este ovală, iar cromatina este netedă, prezentînd însă zone de condensare.

Limfocitul mare are un nucleu ceva mai slab colorat şi cu cromatina mai fragmentată. Ocazional, apar în nucleu formaţiuni inelare reprezentînd reminiscenţe nucleolare. Se pot observa uneori granule azurofile, mai ales în limfocitele mici şi mijlocii. Ele sînt de dimensiuni reduse, tinzînd să fie alungite şi sînt situate la marginea celulei.

Monocitul are nucleul cu contur neregulat, suprafaţa ondulată. Cromatina este fibrilară sau dantelată. Citoplasma este destul de abundentă

şi poate înconjura complet nucleul. Are o culoare albastră-cenuşie, cu aspect neomogen datorită colorabilităţii variate. Granulaţia azurofilă este în general discretă.

Trombocitele au formă ovală, sînt aglomerate, colorate purpuriu-pal, sub formă de granule înconjurate de o citoplasmă albastră-pal. Sînt frecvent reunite în mase de mărimi variabile. Se pot întîlni adesea forme gigante, digitiforme.

La cîine. Hematiile cîinelui sînt foarte mari, comparativ cu ale altor specii domestice (5—9 microni diametru). Marea lor majoritate au zona centrală mai decolorată, imprimînd un aspect inelar. Ocazional, se găsesc corpusculi Jolly şi hematii policromatice. Reticulocitele apar foarte rar la cîini adulţi, în schimb la căţei ele pot fi găsite în proporţie de 20—40%.

Tabloul leucocitar este evident neutrofil (60—80%).

Neutrofilul are un nucleu multilobat, cu proeminenţe rotunjite. Adesea, lobii sînt uniţi numai printr-un filament de cromatină. Cromatina este grunjoasă sau aglomerată în mase intens colorate, contrastînd cu fondul slab colorat al celulei. Citoplasma apare pulverulentă, cu granulaţii difuze.

În procesele patologice pot să apară metamielociţi neutrofili, cu nucleu sferoid sau reniform, cu cromatina mai difuză şi colorabilitatea mai puţin intensă decît a neutrofilului matur. Citoplasma se colorează mai puţin intens şi are un aspect granular, adesea cu o zonă mai palidă în porţiunea de escavaţie a nucleului.

În procesele inflamatorii şi infecţiile bacteriene pot să apară în circulaţia periferică un număr crescut de metamielociţi neutrofili şi, mai puţin frecvent, progranulocite care imprimă un aspect de reacţie leucemoidă.

În procesele toxice, citoplasma poate să apară intens vacuolară.

În deficienţele de vitamină B_{12}, se remarcă o hipersegmentare a nucleului neutrofilelor (5 sau mai mulţi lobi).

Eozinofilul are granulaţii foarte variabile, fie de dimensiuni mici, regulate, fie de dimensiuni mari, neregulate. Uneori, pot apărea numai 2—3 granule cu diametrul de 3—4 microni. Culoarea lor normală nu este mai intensă decît a eritrocitelor din acelaşi frotiu. Rareori, nucleul poate fi parţial acoperit de granule, dar cel mai frecvent se poate vedea în întregime. Citoplasma are o coloraţie albastră-deschisă. Adesea, apar şi vacuole de dimensiuni reduse.

Eozinofilele scad numeric în sînge sub influenţa corticosteroizilor, în timp ce eozinofilia este o reflectare a unei histaminemii crescute care determină atragerea eozinofilelor din măduva osoasă în circulaţia periferică pentru acţiunea antihistaminică.

Bazofilul are granulaţii care variază ca număr, mărime şi intensitate de colorare, dar niciodată nu reuşesc să mascheze prin număr nucleul sau să umple celula. Citoplasma este rugoasă, albastră-cenuşie. Granulele bazofile sînt solubile în apă, astfel încît dacă frotiul este spălat excesiv, celula apare ca un monocit vacuolar.

Bazofilia apare de obicei în asociaţie cu eozinofilia, dar poate apărea şi independent.

Limfocitul variază ca mărime, dar în sîngele periferic cel mai adesea apar limfocite mici. Nucleul este excentric, iar cromatina este gra-

nulată și slab colorată. Citoplasma este albastră-pal, mai slab colorată în jurul nucleului. Granulații albastre-închise sau roșii-azurofile pot apărea ocazional și în număr redus.

Limfocitul oferă indicii prognostice importante. O limfopenie persistentă în bolile cronice este în general de rău augur, în timp ce revenirea numerică a limfocitelor la normal poate fi interpretată ca un semn favorabil.

Monocitul este în general cea mai mare celulă albă dintre leucocitele mature. Caracteristica sa cea mai importantă este citoplasma bazofilă sau albastră-cenușie, grunjoasă. În mod obișnuit, ea prezintă vacuole variabile ca mărime și situate la una din extremități. Un alt fapt semnificativ este apariția granulelor azurofile pulverulente. Nucleul este extrem de variabil, semănînd fie cu al neutrofilului tînăr, fie cu al metamielocitului tardiv. Cromatina nucleară este de obicei difuză. Adesea, nucleul tinde să fie amoeboid.

Trombocitele au mărimi variabile, cel mai frecvent fiind mici, rotunde, cu granulații azurofile înconjurate de o matrice albastră-deschisă. Uneori, se pot observa prelungiri în diferite direcții. Forme gigante, de dimensiunile hematiilor pot apărea în trombocitopenii cu tendință spre remisiune. Administrarea de steroizi stimulează trombocitoza.

La pisică. Hematiile au dimensiuni variabile între 3,2—7,5 microni; la animalele sănătoase pot apărea în număr mic hematii cu resturi nucleare Jolly, eritroblaști și hematii policromatofile. Se întîlnesc însă foarte frecvent la unele animale reticulocite, mai ales sub forma corpusculilor Schmauch.

Tabloul leucocitar, deși este dominat de neutrofile, predominența acestora este mai redusă totuși decît la cîine.

Neutrofilele au un nucleu mare care umple aproape toată celula avînd aspect divizat, neregulat. Condensarea cromatinei nucleare determină apariția unor plăci mai închise la culoare, separate de zone mai slab colorate. Citoplasma este cenușie, cu granulații foarte fine. Metamielociții nu pot fi decelați în sîngele periferic.

Eozinofilele au granule roșietice, numeroase, care pot să acopere parțial nucleul, fără a-l masca complet. Zonele reduse de citoplasmă ce se pot vedea între granule au o colorație albastră-deschisă.

Bazofilele sînt vizibile numai rareori în sîngele periferic, acompaniind de cele mai multe ori eozinofilia. Bazofilul matur din sîngele periferic are o citoplsamă cenușie-deschisă, conținînd granule mici, rotunde. Unele bazofile pot să conțină și granule mai închise.

Limfocitele. Cele mai multe sînt limfocite mici. Nucleul este obișnuit rotund, dar se pot observa și aspecte reniforme. Cromatina este relativ uniform dispersată, fără condensări marcante, iar marginile nucleului sînt distincte. Citoplasma este foarte redusă, situată de obicei într-o parte a celulei, datorită poziției excentrice a nucleului. Ea este albastră, uneori cu un halo perinuclear și condensare marginală. Rareori pot fi observate granule azurofile mici, dispuse marginal sau în escavația nucleului, cînd acesta este reniform.

Monocitele au nucleu rotund sau neregulat; cromatina este filamentoasă, uneori cu condensări. Citoplasma este albastră, ușor granulară, relativ intens colorată. În general, nu conține granulații azurofile, dar pot fi văzute vacuole citoplasmatice.

Trombocitele sînt de obicei mici, sferoide, cu granule azurofile înconjurate de o zonă pală pe un fond albastru. Mărimea lor este variabilă. Pot apărea forme gigante, de mărimea unui eritrocit. Uneori, ele apar alungite sau aglomerate, cu formarea de mase amorfe.

La iepuri. Eritrocitele se înscriu, ca dimensiuni, între 5—7,8 microni. Policromazia apare în mod normal, ca și punctarea bazofilă și eritroblaștii, mai cu seamă la animalele tinere (pînă la un an). La animalele adulte se pot găsi reticulocite pînă la cca 8%, la nou-născuți procentul lor fiind mult mai mare 20—80%.

Tabloul leucocitar este predominat de obicei de limfocite. Neutrofilele lipsesc, dar se întîlnesc în schimb așa-numitele heterofile (polimorfonucleare pseudoeozinofile).

Heterofilul are un nucleu polimorf și neuniform colorat (alternanțe de purpuriu-deschis și albastru-deschis). Citoplasma este roz difuză, din cauza fuziunii granulelor acidofile specifice. Granulele sînt în număr variabil, de culoare roșie, de dimensiuni mari, de formă rotundă, formă de bastonașe sau ambele.

Eozinofilul se distinge de heterofil prin dimensiunile sale mai mari și granulele caracteristice, intens azurofile, de cca 3—4 ori mai mari decît ale heterofilelor, de formă rotundă, umplînd celula.

Bazofilul este prezent în circulația periferică în mod constant. Nucleul are o colorație purpurie-deschisă, iar citoplasma este plină cu granule intens colorate pînă la negru metacromatic, ele fiind mari, de formă rotundă.

Limfocitul are morfologia asemănătoare cu a celorlalte specii. Dimensiunile sînt variabile, în cazul limfocitelor mari existînd și granule azurofile.

Monocitul este o celulă mare, cu un nucleu amoeboid, avînd cromatină puțin intens colorată, cu citoplasmă ce conține cîteva vacuole distincte. În infecții listeriene pot apărea granule eozinofile.

Trombocitele apar sub formă de grămezi de granule azurofile înconjurate de o citoplasmă albastră-deschisă.

La păsări. Tabloul sanguin la păsări este caracterizat de prezența hematiilor nucleate, de formă ovală, de dimensiuni mari (9—14/6—9 microni), alături de care se pot găsi în proporții variabile, uneori pînă la 75%, reticulocite. Ca și iepurii, ele nu posedă neutrofile, ci heterofile (pseudoeozinofile).

Tabloul leucocitar are un caracter predominant limfocitar.

Pseudoeozinofilul (heterofilul) conține granule azurofile în formă de bastonaș sau de fus, care se colorează în roșu strălucitor prin metoda panoptică. Caracterul amfofil al acestor granulații este dat de posibilitatea colorării lor cu coloranții pur acizi sau pur bazici; pe de altă parte termenul de pseudoeozinofil este datorat faptului că granulele își pierd ușor culoarea eozinofilă prin săruri de alcali. Diferențierea granulelor pseudoeozinofile de cele eozinofile se face cu ajutorul unor eozin-gliceride, care colorează numai granulele eozinofile nu și pe celelalte. În anumite stări patologice, pot fi întîlnite heterofile cu granule mici rotunde, de culoare violacee-închisă, sau pot fi prezente ambele tipuri de granulații (sub formă de fus și rotunde). Se pare că heterofilele cu granulații rotunde și mixte sînt de fapt forme intermediare de evoluție, decelabile în sîngele periferic în stările de suprasolicitare.

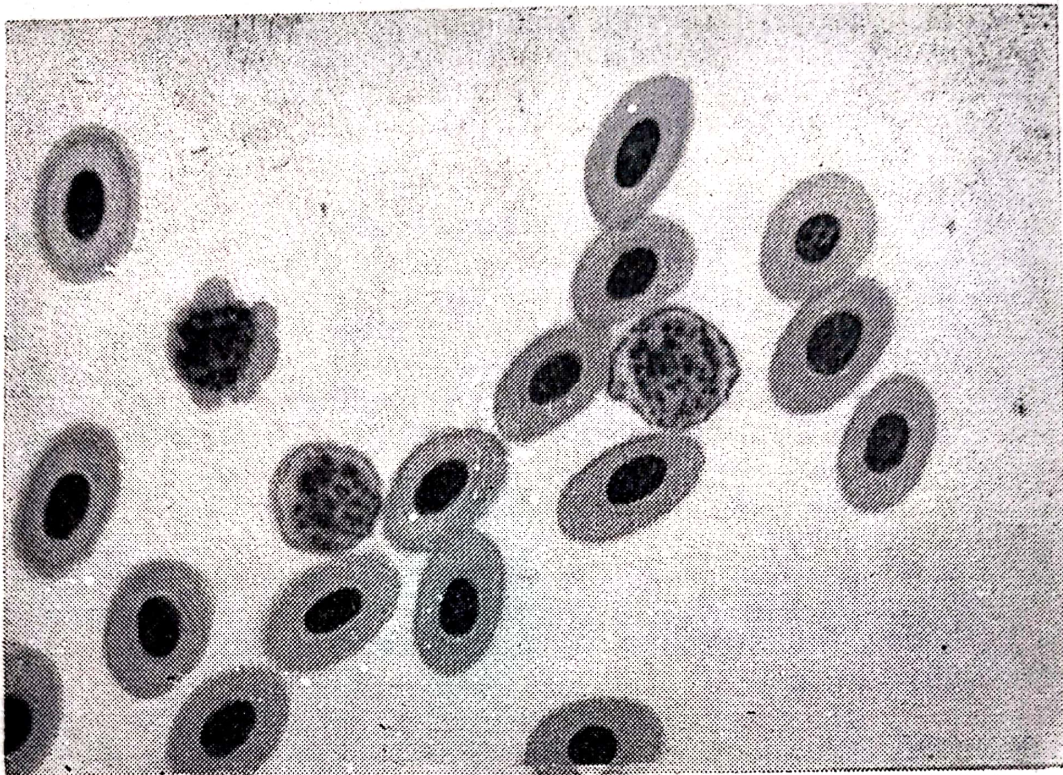


Fig. 137 — Sînge de pasăre (limfocite mici)

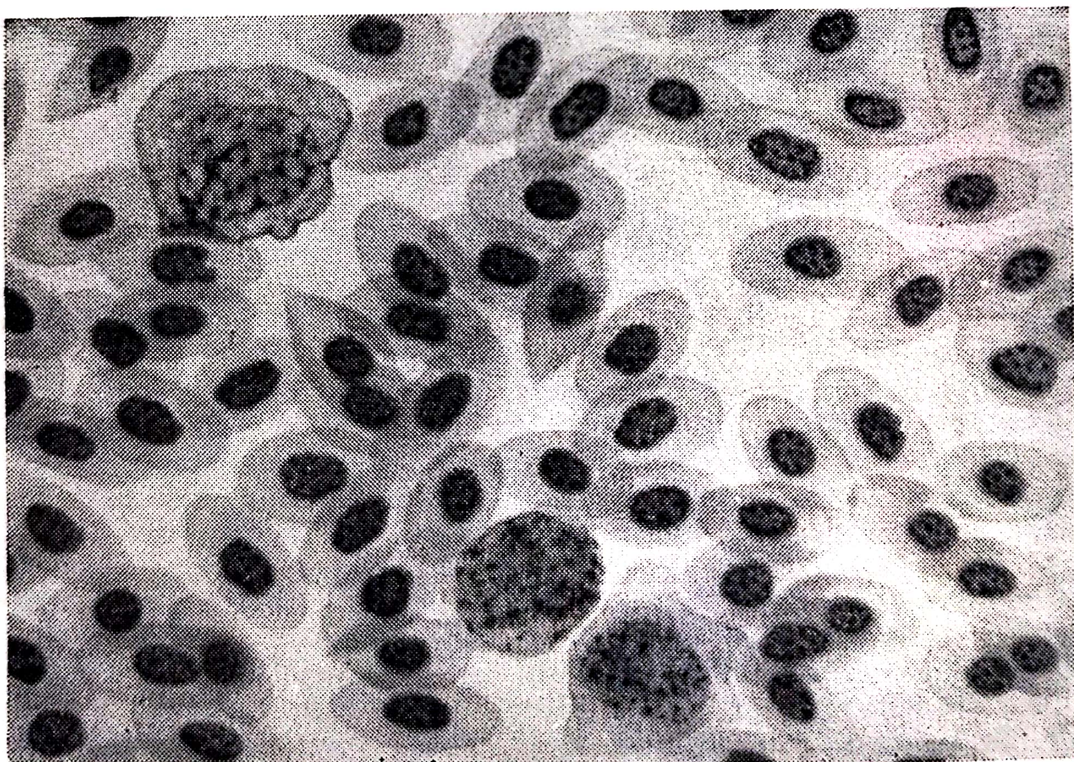


Fig. 138 — Sînge de pasăre (limfocite mari)

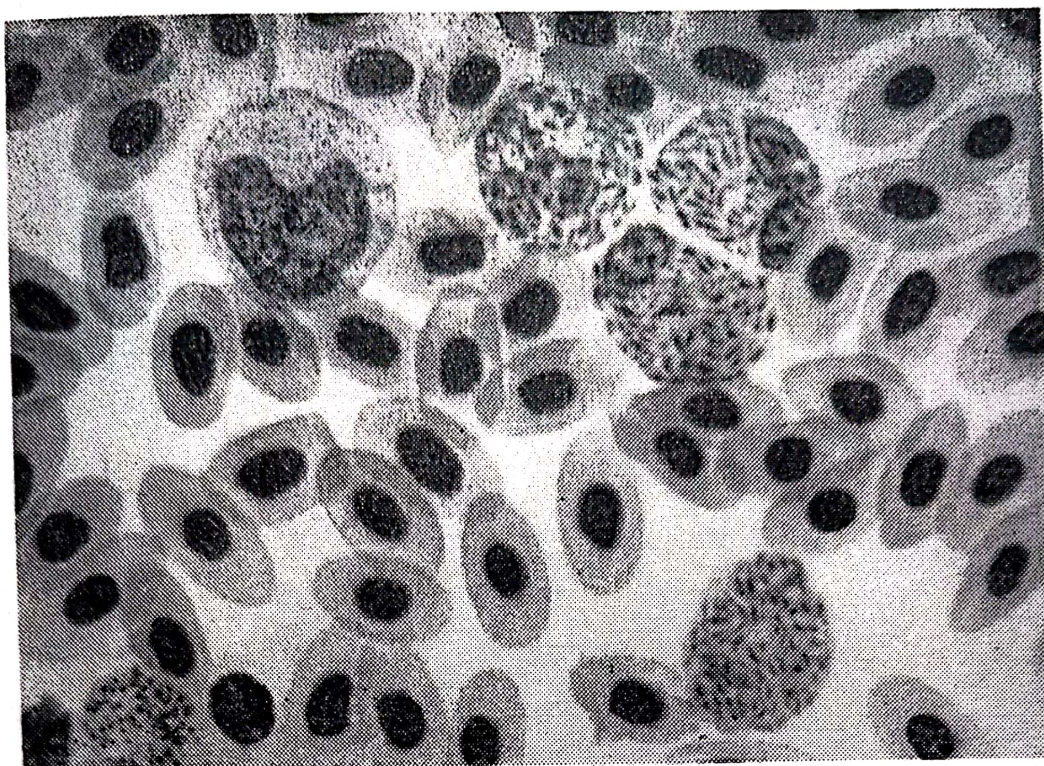


Fig. 139 — Sînge de pasăre (limfocite mari și heterofile)

Eozinofilul conține granule rotunde, uneori de mărimi variabile, de culoare oranj.

Bazofilul se caracterizează prin granule rotunde, uneori sub formă de bastonaș, colorate în albastru-închis, aproape negru.

Limfocitul predomină numeric celelalte elemente figurate albe (în medie 60%). Se deosebesc limfocite mari, cu diametrul de 11—18 microni și limfocite mici (4—10 microni) acestea fiind cele mai frecvente. Ele au un nucleu cu structură uneori grosolană, intens cromatic și o citoplasmă foarte îngustă. Limfocitele mari pot conține granule azurofile.

Monocitul. În legătură cu prezența acestei celule în sîngele păsărilor, există încă păreri contradictorii. Ținînd seama de faptul că păsările dispun de sistem reticulohistiocitar, se poate admite și existența monocitelor în sîngele normal. Diferențierea lor de limfocite este însă extrem de dificilă, încît cei mai mulți autori le încadrează în grupul limfocitelor.

Trebuie subliniat și faptul că pe frotiurile de sînge aviar se găsesc frecvent globule albe distruse (umbre), leucocite cu prelungiri amoeboidale precum și alte celule greu de încadrat între eritrocite, celule fusiforme (trombocite) sau limfocite mici, sistemul leucopoetic fiind foarte labil.

Trombocitele sînt celule nucleate, de formă oval-alungită, fusiformă, cu citoplasma colorată în albastru-murdar și nucleul violet-închis. Nucleul este mare, ocupînd uneori aproape întreaga celulă, situat central sau periferic. În citoplasmă, de obicei la unul din poli, se pot observa 1—3 corpusculi de cromatină ce pot fi legați între ei și cu nucleul prin punți cromatiniene. Trombocitele sînt dispersate în frotiu, neexistînd aspectul de „grămezi" ca la mamifere.

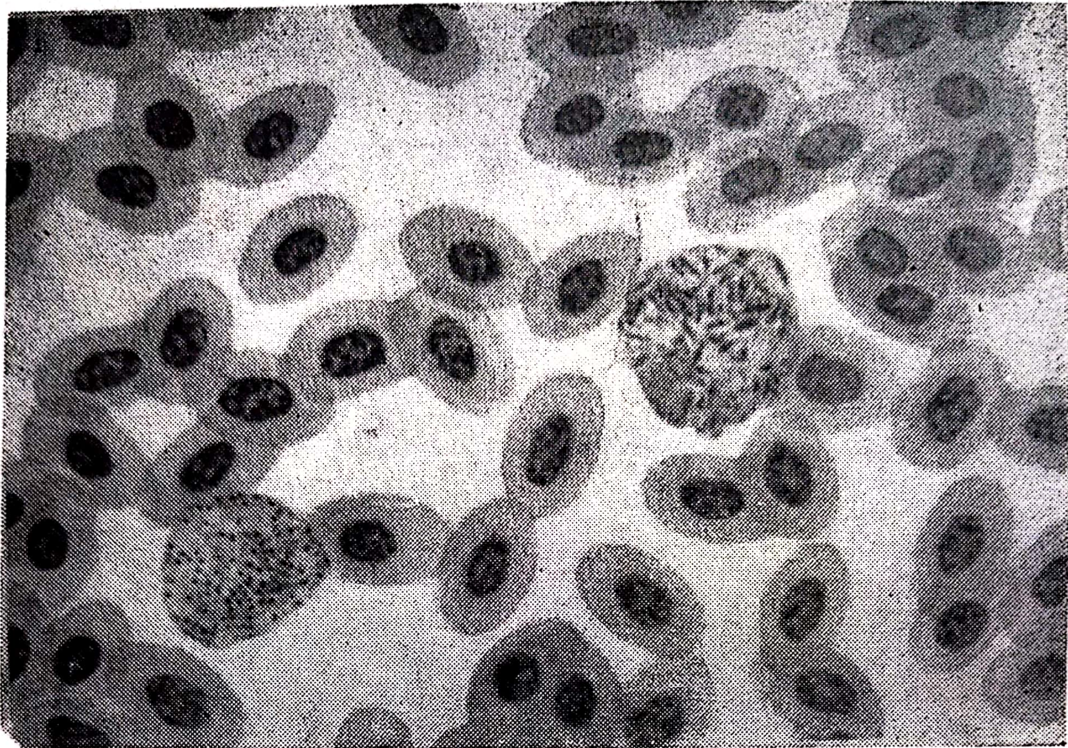


Fig. 140 — Sînge de pasăre (heterofile cu granulaţii sferoide şi în formă de bastonaş)

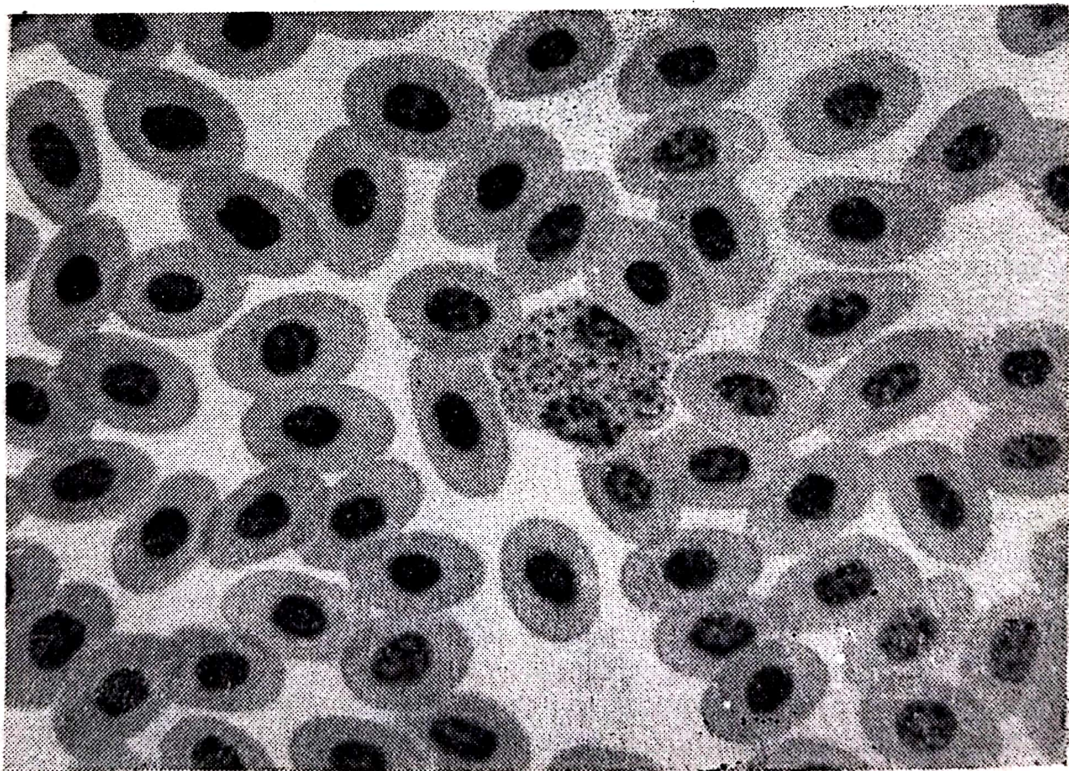


Fig. 141 — Sînge de pasăre (eozinofil cu nucleu trilobat)

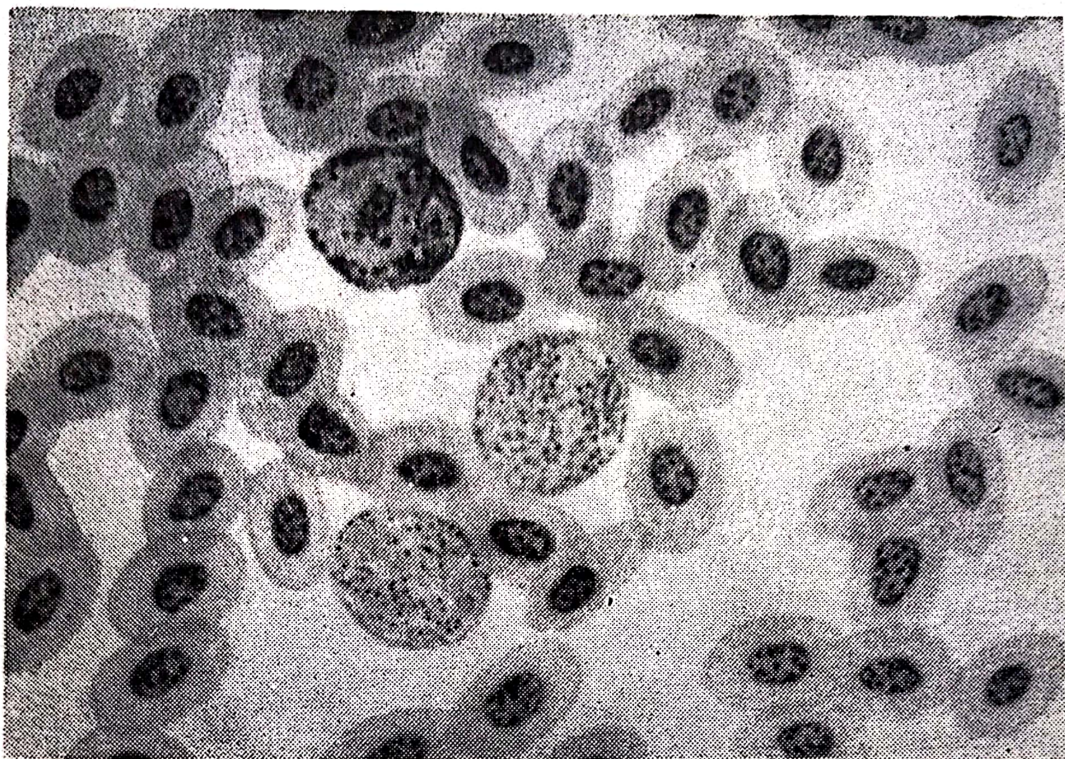


Fig. 142 — Sînge de pasăre (heterofile şi bazofile)

În privinţa originii şi rolului acestor celule fusiforme din sîngele păsărilor, există de asemenea păreri contradictorii. Unii autori consideră că ele ar fi de fapt eritrocite supramaturate, dehemoglobinizate, care au un rol minor în mecanismele de coagulare a sîngelui.

Citodiagnosticul

În cercetarea celulei, progrese considerabile au fost înregistrate în ultimele decenii datorită unor mijloace moderne de investigație, cum sînt citochimia, citoenzimologia, citoimunologia, citogenetica, microscopia electronică. Cu toate acestea microscopia optică clasică rămîne încă cea mai utilă în practica zilnică. Citodiagnosticul se bazează pe folosirea datelor furnizate de examenul unor celule existente în diferite țesuturi extrase prin puncție sau în diferite lichide de revărsare (exsudate sau transsudate) precum și în unele lichide naturale (lichidul cefalorahidian, urină, secreții nazale, lapte etc.) sau alte lichide patologice.

Existența în aceste lichide a unor elemente celulare reprezintă indicii deosebit de prețioase în caz de procese inflamatorii, procese septice, tumorale sau de altă natură. Dintre principalele metode utilizate în acest scop pot fi enunțate cîteva.

1 – Puncția medulo-osoasă

Vizează extragerea de măduvă osoasă, cu scopul de a stabili mielograma, respectiv structura citologică a acestui țesut. Locurile de elecție pentru puncția medulară sînt: sternul, unghiul extern iliac și ultimele 8 coaste. Primele două sînt cele mai larg folosite în medicina veterinară. Puncția se va efectua cu ace de puncție osoasă inoxidabile și sterile, avînd un diametru mai mare de 1—1,2 mm. Este preferabil ca acul să fie prevăzut cu un dispozitiv de oprire reglabil pentru adîncimi variabile. El trebuie, de asemenea, să poată fi adaptat la seringă. În cazul puncției sternale, după prealabila anestezie locală, prin infiltrație pînă la periost, cu novocaină 4—8% și după toaleta locală corespunzătoare, se face puncția straturilor cutanate pînă la periost în dreptul coastelor 2—4 și apoi se face reglarea adîncimii de 5—8 mm, după care se străpunge stratul cartilaginos, respectiv osos, preferabil printr-o mișcare de rotație ușoară. Odată acul pătruns în cavitatea osoasă se extrage mandrenul și se adaptează seringa sterilă și perfect uscată. Prin aspirație puternică, în seringă va apărea lichidul medular de culoare roșie (nu se scot mai mult de 0,2—0,3 ml). Se extrage brusc acul și se aplică un tampon cu tinctură de iod.

Conținutul seringii se trece rapid într-o sticlă de ceasornic sau pe o lamă. Din lichidul medular se fac frotiuri care, colorate prin metode

obişnuite (de exemplu May Grünwald-Giemsa), vor permite examinarea tipurilor de celule, întocmai ca în cazul frotiurilor din sînge. La interpretarea datelor se va lua în consideraţie mai ales raportul dintre elementele seriei mieloide şi eritroide ($\frac{M}{E}$) care exprimă coeficientul hematopoetic, cel mai important indice al activităţii medulare. Se vor cerceta 500—1000 elemente citologice. Coeficientul hematopoetic variază cu specia, vîrsta şi starea fiziologică între anumite limite (la cal 0,94—3,76 la vacă 0,57—2,59). Mielograma se impune în toate bolile traduse prin anemii persistente, intermitente, remitente, în paracitemii, în boli hemoragipare (stahibotriotoxicoza, anemia purceilor, intoxicaţii micotice sau de altă natură). În filarioza avansată, de exemplu, se constată o scădere a elementelor mieloide şi creşterea eritroidelor; în limfadenite mielograma se caracterizează prin reacţie limfocitară, în anemia infecţioasă creşte seria mieloidă în detrimentul celei eritroide; în anemiile aplastice (aregenerative) se constată prăbuşirea eritropoezei; în anemiile hemolitice se produce o intensă proliferare a seriei eritroblastice, iar în diferite tipuri de leucoză se vor produce substanţiale modificări în seria elementelor albe, în sensul creşterii numărului acestora, corespunzător tipului de leucoză.

2 – Puncţia ganglionară

În comparaţie cu mielograma, citograma limfoganglionară ocupă un loc modest în diagnosticul clinic, fapt datorat mai ales uşurinţei cu care se poate efectua examenul histopatologic al ganglionilor, acesta furnizînd şi avantajul că, păstrînd arhitectura tisulară normală, permite o mai fidelă interpretare a modificărilor celulare. Cînd se foloseşte totuşi (este cazul unor suspiciuni de neoplasm al căror diagnostic este important) datele furnizate sînt foarte importante pentru aplicarea măsurilor corespunzătoare legate atît de individ, cît şi de efectiv.

Puncţia ganglionară este o operaţiune simplă şi expeditivă, efectuîndu-se cu ace prevăzute cu mandren, după prealabila toaletă locală. Extragerea de conţinut tisular se face prin aspirare cu seringa, după care urmează etalarea pe lame de microscop, colorarea şi examinarea.

De regulă, materialul obţinut prin puncţie nu ajunge pînă în seringă ci ocupă numai o parte din lumenul acului. Partea solidă a punctatului nu se pretează pentru etalare în bune condiţii şi din acest motiv se va utiliza partea fluidă.

Metoda are însă şi unele dezavantaje: uneori fragmentele de ţesut prin etalare suferă alteraţii mecanice, celulele fixe rezistă la aspiraţie, astfel încît frotiurile obţinute nu redau întotdeauna cu fidelitate celularitatea ganglionară, uneori elementele importante pentru diagnostic pot scăpa observaţiei mai ales datorită faptului că, spre deosebire de măduva osoasă, modificările patologice sînt dispuse în focare.

Metoda furnizează date utile în caz de adenopatii cum sînt:

— adenitele inflamatorii acute (se constată hiperplazie a elementelor limfoide în prima fază, urmată de proliferarea celulelor endoteliale macrofage, a celulelor reticulare precum şi a seriei plasmocitare şi bazofilelor);

— limfadenite purulente (se constată că țesutul limfoid este invadat de macrofage încărcate cu pigmenți și resturi celulare);

— limfadenite cronice nespecifice (fond limfoid, format în majoritate din elemente mature și rare celule reticulare, plasmocite, histiocite, mastocite);

— limfadenite specifice tuberculoase (în faza incipientă hiperplazie inflamatorie nespecifică, pentru ca apoi să se constituie o structură caracteristică: fond limfocitar, celule epiteloide, gigante și mase necrotice; lipsa granulocitelor după unii, ar fi caracteristică);

— adenopatiile alergice (proliferare limforeticulară și hiperplazie intensă eozinofilică; spre deosebire de limfadenitele banale, nu sînt proliferate plasmocitele, iar semnele de fagocitoză lipsesc);

— limfadenopatiile tumorale (proliferarea diferitelor tipuri celulare, în funcție de natura procesului tumoral — reticulosarcoame, limfosarcoame, limfogranulomatoză, metastazele carcinomatoase etc.).

3 – Examenul lichidelor de revărsare patologice

Cu toate că diagnosticul citologic al revărsatelor a fost inițiat de aproape un secol, metoda rămîne încă dificilă, posibilitățile de eroare fiind mai mari decît în alte domenii ale citologiei. Cauza principală rezidă în greutatea de a delimita elementele mezoteliale normale, degenerate sau atipizate secundar, de celulele maligne.

Obținerea lichidelor patologice de revărsare se face prin puncție exploratoare. Ea se practică cu ace de seringă sau trocare speciale cu care se face extragerea acestor lichide de la nivelul unor cavități preformate (peritoneală, pericardică, articulară) sau de la nivelul unor organe (hematoame, abcese, chiști de diferite naturi etc.). Citodiagnosticul se face utilizînd sedimentul de repaus sau cel obținut prin centrifugare. Examinarea se execută pe preparate native (direct) sau pe frotiuri care se colorează după tehnici corespunzătoare. Celula specifică a revărsatelor este celula mezotelială. La aceasta se pot adăuga elemente reticulo-histocitare, elemente sanguine și celule tumorale.

Transsudatele sînt lichide ce apar consecutiv filtrării componentelor sîngelui prin peretele vascular fizic intact și se caracterizează printr-o masă specifică sub 1015, iar conținutul proteic este sub 2,5%. Conținutul celular al acestor lichide este redus (sub 200—300 elemente/mm^3). Dintre acestea circa două treimi sînt elemente mezoteliale, o treime limfocite și circa 5% granulocite, la care se adaugă și rare hematii. În transsudatele vechi elementele mezoteliale cresc numeric și volumetric, apărînd și forme degenerative sau atipice, cu hipercromazie, deformări nucleare, celule balonizate, la care se adaugă celule în mitoză, astfel că elementele pot simula la prima vedere celule tumorale.

Exsudatele se datoresc acumulării active de lichid în cavitățile seroase, asociată cu lezarea pereților capilarelor. Ele au un conținut proteic de peste 2,5%, o masă specifică peste 1015, cu o cantitate mare de fibrină, ce determină o coagulabilitate ridicată, uneori instantanee, în momentul extragerii și al contactului cu atmosfera. În aceste lichide, se constată și o abundență celulară peste 500—1500 elemente/mm^3, constituită din polimorfonucleare neutrofile, la care se adaugă un număr redus de elemente

mezoteliale și limfocite. În perioada de convalescență, limfocitele și celulele mezoteliale cresc numeric, iar neutrofilele scad, concomitent apărînd forme degenerative, iar în celulele mezoteliale se produc vacuole, cromatina își pierde finețea, transformîndu-se în mase grosiere. În ultima fază, apare procesul de fagocitare a granulocitelor degenerate de către celulele mezoteliale și histiocitare.

Exsudatele inflamatorii cronice au tabloul citologic aproape în întregime ocupat de limfocite.

În procesele septice, alături de o masă celulară abundentă se constată și prezența unei flore bacteriene bogate, cu fenomene de fagocitoză ale acesteia bine reprezentate.

În procesele neoplazice se vor găsi celule monstruoase, cu 1—2 nuclei hipercromici pe cale de diviziune. Aceste elemente sînt dispuse în ghemuri, așa că nu apar la microscop ca celule epiteliale, într-un singur plan. În leucemia limfoidă, ca și în inflamațiile specifice (tbc) este prezentă o limfocitoză marcată.

În cazul altor lichide de puncție componența celulară este variabilă cu natura lichidului:

— în cazul lichidului hidroamniotic apar celule epiteliale de dimensiuni mari;

— în lichidul chistic ovarian apar elemente figurate sanguine și celule epiteliale cilindrice;

— în lichidul echinococic se pot descoperi porțiuni din membrana chistului hidatic, alături de scolecși (examinarea se face pe preparatul proaspăt și necolorat);

— în cazul lichidului peritoneal de natură hidronefrotică se constată, alături de celulele care constituie epiteliul tubilor renali, și cristale de uree și de acid uric;

— în lichidul de puncție articulară — în caz de inflamații acute — se constată o abundență de polinucleare neutrofile și fibrină; în artritele tuberculoase predomină limfocitele;

— în lichidul de puncție testiculară (în caz de hidrocel) alături de celulele caracteristice procesului inflamator, se găsesc în număr variabil, și celule endoteliale și spermatice; în orhitele acute de natură brucelică se constată o predominanță a mononuclearelor.

4 – Examenul citologic al lichidului cefalorahidian

Cunoașterea citologiei lichidului cefalorahidian are o valoare deosebită pentru stabilirea diagnosticului într-o serie de întreagă de boli, în care sînt afectate meningele și encefalul. Studiul structurii celulare a acestuia reprezintă o adevărată „biopsie" a meningelui, după cum afirmă R a m o n și valorează, uneori, cît un examen histopatologic al acestuia.

Pentru obținerea lichidului cefalorahidian se recurge la puncția rahidiană și, foarte rar, la puncția ventriculilor laterali. Puncția rahidiană poate fi practicată la înălțimi variabile (occipito-atloidiană, cervicală atlo-axoidiană, lombară și sacro-codală).

Deși la animale nu sînt stabilite încă exact, la toate speciile variațiile normale și patologice ale citorahiei, examenul lichidului cefalorahidian este de cea mai mare importanță pentru diagnosticul clinic al boli-

lor cu manifestări nervoase. Examenul se poate executa fie direct din lichid, fie din depozitul de centrifugare sau de sedimentare. Colorarea elementelor celulare se face cu violet de metil 0,20%, prin metoda May Grünwald-Giemsa sau cu o soluţie de cristal violet 1%. În cazurile patologice şi mai puţin în cazurile normale, sedimentul poate să dea o valoare relativă a numărului de elemente şi date despre originea lor.

Pentru stabilirea numărului de elemente celulare se recoltează lichidul cefalorahidian, se pune într-o eprubetă şi se adaugă cîte o picătură de violet de metil sau de cristal violet, la fiecare mililitru lichid, omogenizîndu-se. Apoi cu o pipetă Pasteur se va pune o picătură pe unul din şanţurile laterale ale unei camere de numărat de tip Nageotte sau alt tip şi, după o sedimentare de 10—15 minute, se examinează la microscop, procedîndu-se întocmai ca la hematimetrie, cu menţiunea că nu se mai fac calculele respective. O apreciere aproximativă se poate face şi prin cercetarea a 5—6 cîmpuri microscopice din preparatele făcute din sediment.

Creşterea numărului de elemente albe şi în multe cazuri şi a elementelor roşii (pleiocitoza) se întîlneşte în toate reacţiile meningiene de origine toxică, toxiinfecţioasă şi microbiană şi mai rar în reacţii tumorale meningiene.

Elementele întîlnite în lichidul cefalorahidian în stări patologice sînt diferite. În afară de limfocitele mari şi mici, care se întîlnesc şi în stare normală, alături de rare elemente endoteliale — denumite pentru forma lor şi „celule cu coadă“ — se vor întîlni şi alte tipuri de celule:

— neutrofile polinucleare — expresie a infecţiilor microbiene;

— limfocite, exprimînd neuroviroze şi intoxicaţii;

— în listerioză şi cenuroză la rumegătoarele mari şi mici — pe lîngă o pleiocitoză de tip limfocitar se găsesc şi nişte formaţiuni sub forma unor aglomerări celulare de aspect neuniform, formate din endoteliul subarahnoidian; ele corespund mai ales stărilor întovărăşite de edem cerebral;

— în meningoencefalite microbiene (listeriene) numărul elementelor albe poate să depăşească 300—400 elemente pe mm^3; pleiocitoza se întîlneşte şi în: febra catarală malignă, durină, turbare, jigodie, boala de Teschen.

5 – Examenul citologic al sedimentului urinar

Examinarea microscopică a sedimentului urinar este de o deosebită importanţă pentru precizarea diagnosticului, mai ales în bolile aparatului excretor renal.

În acest scop, se va folosi urina prospăt recoltată prin cateterism sau prin emisiune provocată. În ambele situaţii, se va lua, pentru examenul citologic, urina din ultima parte a recoltării. Dacă examenul nu se poate face imediat, se poate recurge la conservarea urinei la temperaturi joase (+4 +6°C) eventual cu un adaos de antibiotice, pentru a evita dezvoltarea florei microbiene, generatoare de fermentaţii şi procese chimice, al căror rezultat este modificarea tabloului cito-microscopic al urinei.

Pentru obţinerea sedimentului urinar, se va recurge la conservarea urinei în pahare conice cu picior, ori se va face filtrarea sau centrifuga-

rea. Sedimentarea în repaus se obține după cîteva ore, după specie (2—3 ore la rumegătoare, 12—15 ore la cal). La cal urina are, în mod normal, un abundent sediment mucos, care jenează mult examenul. Pentru îndepărtarea acestui sediment (nubecula) se indică adăugarea cîtorva picături de amoniac, clorură de calciu sau administrarea prealabilă de carbonat de sodiu. Urina primește un aspect tulbure, ceea ce impune o filtrare. Sedimentul obținut pe filtru se recuperează prin spălare cu apă acidulată, după care se poate cerceta prin mijloacele obișnuite.

În cazul centrifugării este bine ca analiza sedimentului să se facă sub formă de fracțiuni, mai ales la animalele în a căror urină se găsesc mari cantități de săruri minerale (erbivore). Prima centrifugare se face pe o durată scurtă (30—60 secunde), după care aceeași urină se pune în altă fiolă de centrifugare și se supune la 3000 turații/minut, timp de 20—30 minute.

Examenul sedimentului se poate face între lamă și lamelă fără nici o colorație prealabilă, sau după colorare. Pentru examenul sedimentului colorat se poate folosi o soluție de formol 10%, la care s-au adăugat 2 g% albastru de metilen. Din această soluție colorantă (sol. Liebman), se pun 4—5 picături peste sediment și se omogenizează cu o pipetă Pasteur. Se spală de 2—3 ori cu ser fiziologic, centrifugîndu-se de fiecare

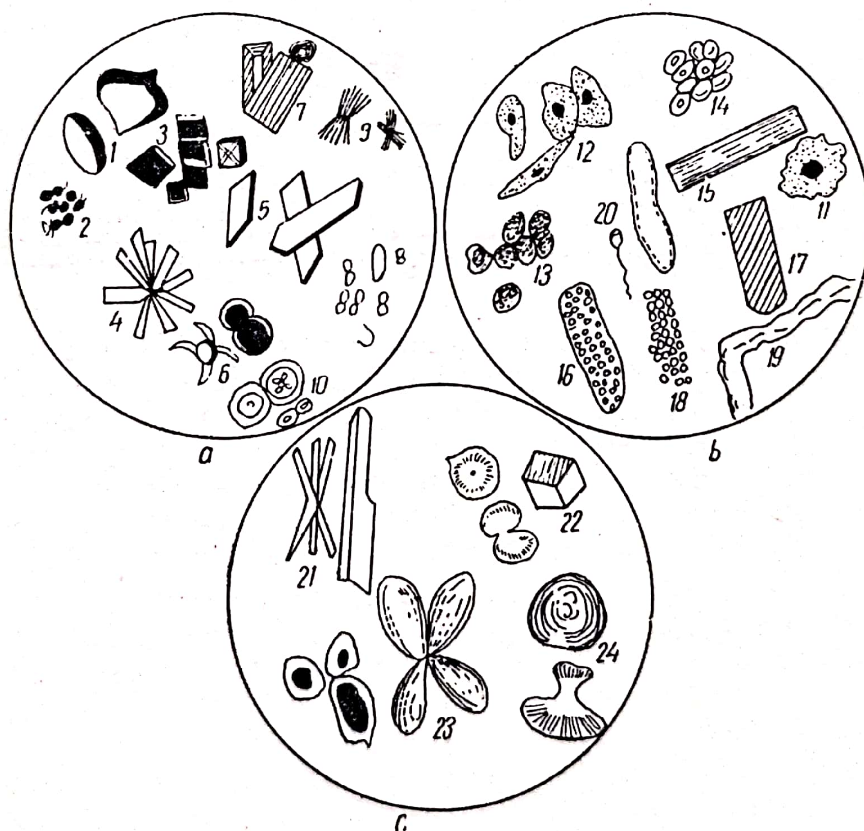


Fig. 143 — Examenul microscopic al urinei

a — sediment neorganizat (*1* — acid uric, *2* — urat de sodiu, *3* — oxalat de calciu, *4* — fosfați de calciu, *5* — acid hipuric, *6* — urat de amoniu, *7* — tartrat amoniaco-magnezian, *8* — carbonat de calciu, *9* — tirozină, *10* — leucină); *b* — sediment organizat (*11* — epitelii vaginale și vezicale, *12* — epitelii din bazinet, *13* — leucocite, *14* — hematii, *15* — cilindri hialini, *16* — cilindrii granuloși, *17* — cilindri ceroși, *18* — cilindri grăsoși, *19* — cilindroizi, *20* — spermatozoizi); *c* — sediment de cristale de sulfamide (*21* — cristale de sulfanilamidă, *22* — cristale de sulfatiazol, *23* — cristale de sulfapiridină, *24* — cristale de sulfadiazină)

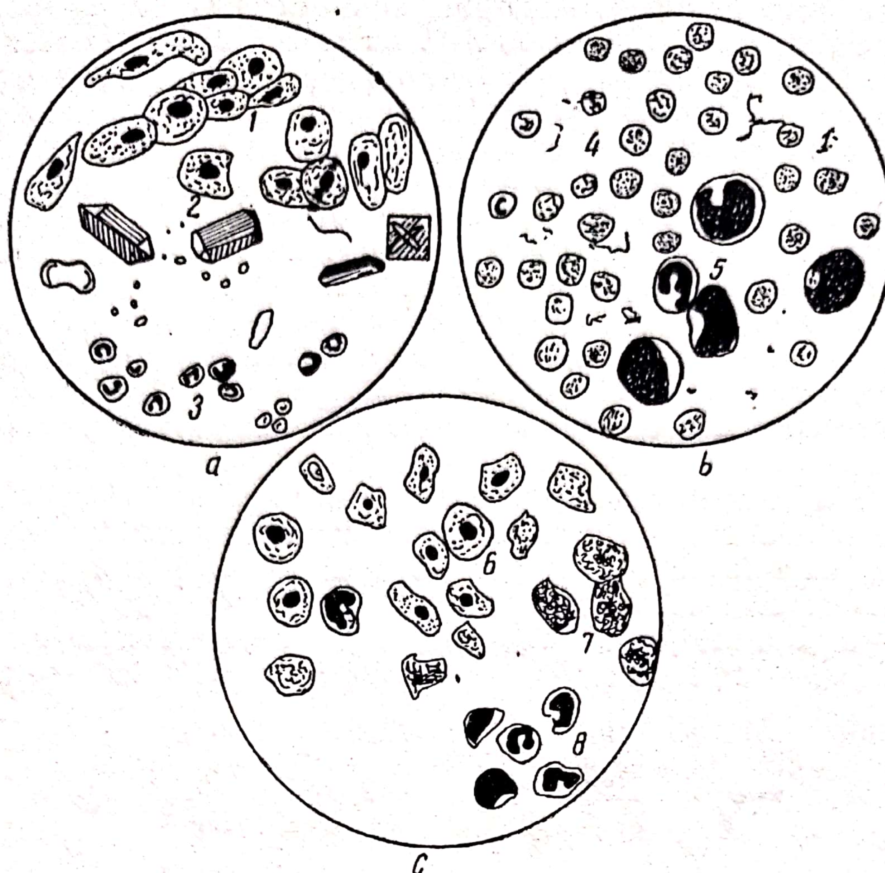


Fig. 144 — **Examenul citologic al urinei**

a — sediment urinar în cistita acută (*1* — epiteliu plat din stratul superficial, *2* — celulă epitelială izolată, *3* — granulocite neutrofile); *b* — sediment în pielonefrită (*4* — hematii, *5* — leucocite); *c* — sediment în nefrita acută (*6* — epiteliu renal alterat, *7* — celule mari cu nuclei puțin vizibili, *8* — leucocite)

dată, iar ultimul sediment se examinează între lamă și lamelă. Se poate recurge și la colorarea direct pe lamă, adăugîndu-se peste sediment un număr egal de picături de colorant și acoperind totul cu o lamelă. Nucleii celulelor și bacteriile vor apărea colorate intens, cilindrii ceroși iau o culoare albastră-închisă; cilindrii hialini iau o culoare albastră-deschisă iar hematiile apar albastre-cenușii. Se poate recurge și la alte metode de colorare (cu soluție Lugol, cu albastru de tripan, roșu de Congo etc.).

Din punct de vedere citologic, în urină pot fi decelate în mod normal elemente celulare epiteliale, provenite din descuamarea epiteliului căilor urinare. În cazuri patologice, apar celule al căror aspect diferă după etajul segmentului genito-urinar din care s-au desprins. Pe baza lor se poate diagnostica caracterul și chiar nivelul leziunilor.

Celulele epiteliale renale apar de formă rotundă sau poliedrică, cu un nucleu mic strălucitor, bine conturat. Citoplasma, în majoritatea cazurilor, apare granulară din cauza proceselor degenerative. În general, citoplasma celulelor epiteliale ale tubilor contorți are aspectul granular, iar cea a celulelor ramurii descendente Henle are aspect clar. Celulele epiteliului renal propriu-zis sînt de cele mai multe ori solitare, rareori sub formă de grămezi. Prezența acestor celule renale indică procese inflamatorii acute (tubulonefrite, pielonefrite, congestii renale, infarcte hemoragice renale).

Celulele epiteliale ale conductelor urinare pot fi de trei feluri:

a) celule mari, late, poligonale, cu unghiuri multiple, cu nucleu mic, slab colorat sau clar, lipite mai multe la un loc, sub formă de placarde. De obicei, apar abundente în cursul congestiei tractusului urinar (vezica și uretra). Ele sînt de obicei în stratul superficial al sedimentului;

b) celule alungite, asimetrice, inegale la cele două extremități, apărînd de cele mai multe ori sub formă de rachetă, de fus sau de măciucă, cu un nucleu mic, însă bine evidențiat, așezat întotdeauna în partea cea mai voluminoasă a celulei. Aceste celule sînt în stratul mijlociu al sedimentului;

c) celule de dimensiuni mici, rotunde sau ovale, cu nucleu mic și evident. Toate aceste tipuri de celule caracterizează stările catarale.

Leucocitele apar de cele mai multe ori sub formă de granulocite polinucleare. Dacă se adaugă sedimentului cîteva picături de hidrat de potasiu, nucleii acestor celule devin mai ușor colorabili (în mediul alcalin ele se tumefiază). Piuria arată un catar al căilor urinare, pielită, pielonefrită, abcese renale, nefrite purulente, uretrite și mult mai rar nefroze.

Hematiile apar numai în cazuri patologice, rareori, și numai la unele specii (cățea, pisică), în anumite momente ale ciclului sexual normal. Hematuria poate fi macroscopică (vizibilă prin aprecierea culorii și a sedimentului) sau microscopică, observabilă numai după centrifugare sau sedimentare îndelungată (microhematurie). La examenul microscopic, hematiile apar solitare sau grupate sub formă de cilindri hematici și cheaguri. Hematuria se semnalează în congestii, infarct renal, nefroze necrotice în unele nefrite cronice, cistita cronică a rumegătoarelor, tumori vezicale, bolile hemoragipare, antrax, intoxicații cu plante toxice, rujet, pestă porcină.

Cilindrii urinari apar ca mulaje sau tipare ale canalelor urinare superioare, ale tubilor uriniferi avînd o formă alungită, cilindrică, cu extremitățile de aspect variabil: drepte, spintecate, neregulate. Formarea lor are ca substrat desprinderea epiteliilor tubilor urinari și legarea lor în conglomerate prin produsele de exsudație și mai ales prin fibrină. După structura lor cilindrii urinari pot fi:

a) *cilindrii epiteliali* apar ca formațiuni arcuite, uneori spiralate sau chiar ramificate, în care celulele componente au delimitări nete și toate însușirile epiteliului tubular renal (protoplasmă abundentă și nucleu de dimensiuni reduse). Alteori, celulele componente au contururi abia vizibile, datorită proceselor degenerative care s-au instalat. Prezența lor denotă tulburări congestive renale precum și procese degenerative în prima fază, sau nefrite acute interstițiale, pielonefrite și mai rar nefrite cronice;

b) *cilindrii granuloși* sînt întîlniți mai des în urina carnasierelor. Ei au aceeași origine ca și precedenții, doar că, datorită fenomenelor de degenerescență granulară a celulelor, apar ca formațiuni scurte, mai groase, drepte sau încurbate. Contururile celulare sînt de obicei șterse. Se întîlnesc în inflamațiile acute și cronice ale rinichiului, în degenerescența granuloasă și amiloidă a acestuia;

c) *cilindrii hialini* rezultă fie din coagularea albuminei exsudate, fie din degenerarea hialină a cilindrilor epiteliali. Ei apar ca formațiuni transparente, incolore, cu contur net, cu structură omogenă. Se evidențiază mai bine după colorare cu soluție Lugol. Se întîlnesc în toate infla-

mațiile rinichiului, în staze renale, uneori în cursul albuminuriei de natură toxică. Ei nu au o semnificație patologică, dacă nu coexistă cu alte elemente ale stărilor respective (celule epiteliale, leucocite, hematii, cilindri etc.);

d) *cilindrii ceroși* sînt asemănători cu cei hialini, dar au o refringență caracteristică și o colorație gălbuie. Se diferențiază de cilindrii hialini prin aceea că nu dau reacția amiloidului cu soluția Lugol, precum și prin rezistența față de soluțiile acide. Cu acidul osmic se colorează în brun. Prezența lor indică o nefrită cronică, parenchimatoasă, nefroza grasă;

e) *cilindrii grăsoși* sînt alcătuiți din celulele tubilor contorți, care au suferit fenomene de degenerescență grasă (în intoxicații cu Pb, As sau în unele nefrite cronice). Au un contur clar și în masa lor se disting picături sau cristale de acizi grași. Se colorează în negru cu acid osmic și în roșu cu Sudan III. Se întîlnesc în urina carnasierelor și mai ales a felinelor și niciodată în aceea a erbivorelor;

f) *cilindrii leucocitari* sau purulenți sînt asemănători celor epiteliali cu singura diferență că sînt formați din elemente leucocitare îngrămădite. Ei se pot forma de fapt și prin infiltrarea cu elemente albe a unor cilindrii de altă natură. Prezența lor indică nefrita purulentă, pielonefrite, pielite. Se întîlnesc mai frecvent în urina rumegătoarelor mari la care se semnalează mai des aceste stări. Ei au o semnificație prognostică gravă;

g) *cilindrii hematici și hemoragici* reprezintă conglomerate de globule roșii, între care se pot găsi rare leucocite. Au o culoare glabenă-deschisă pînă la galbenă-brună, dimensiuni reduse (sînt mici și scurți) și denotă congestii renale, infarcte hemoragice, nefroze și nefrite în faze incipiente;

h) *cilindrii hemoglobinici* rezultă din degenerarea cilindrilor hematici, sau impregnarea cu hemoglobină a cilindrilor hialini. Au o culoare verde-gălbuie, pînă la brună și au dimensiuni reduse. Semnificația lor patologică este aceeași ca a celor hematici;



Fig. 145 — **Aspect citologic în inflamații ale seroaselor (mezotelii tinere)**

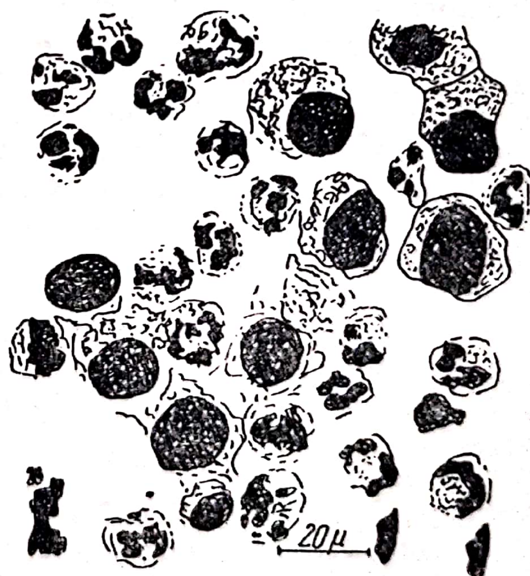


Fig. 146 — **Aspectul citologic în pleurezia tuberculoasă incipientă (mezotelii tinere și polinucleare neutrofile)**

i) *cilindrii biliari* apar ca nişte grămezi de culoare glabenă-deschis, pînă la brunie. Prin reacţia Gmelin cu acid azotic se colorează diferit — roşu, violet, albăstrui sau verde;

k) *cilindrii bacterieni* apar mai ales la rumegătoare mari în cursul pielonefritei şi sînt constituiţi din grămezi de bacterii (mai ales *Corynebacterium bovis).*

În afară de aceştia, în sedimentul urinar se mai pot constata:

— *detritusuri celulare* care provin din descompunerea elementelor citologice ce se desprind de la nivelul rinichiului şi al căilor urinare şi sînt mai abundente în inflamaţii ale aparatului urogenital;

— *spermatozoizii* care se găsesc mai rar la animalele mari şi mai frecvent la cîine, mai ales după stările asfixice, accese epileptiforme sau excitaţii genezice;

— *celulele tumorale* care se găsesc în caz de neoplasme ale sectorului urogenital.

De asemenea, în sedimentul urinar se pot găsi şi diferiţi paraziţi: *Filaria haemorrhagica* la erbivore, *Dirofilaria imitis* la cîine, ouă de strongili *(Dioctophyme renale)* la cal, carnasiere, coccidii la gîşte, *Schistosoma* la rumegătoarele mari, *Stephanurus* la porc, *Trichomonas* etc.

Metode de examinare a micoplasmelor și infecțiilor micoplasmice

Micoplasmele sînt microorganisme care trec prin filtrele Seitz, EK, Chamberland L_1 și L_2 (nu și prin L_3), greu colorabile prin metode obișnuite, care provoacă o serie de procese patologice la diferite specii de animale.

Cele mai importante specii izolate de la animale sînt arătate în tabelul 8.

Tabelul 8

Principalele specii de micoplasme izolate de la animale

Gazda	Specia de micoplasme	Sediul în organism sau infecția din care se izolează
Taurine	M. mycoides	Peripneumonia contagioasă
	M. bovigenitalium	Stări de infecunditate
	M. bovirhinis	Mamite, pneumonii, epifit al căilor respiratorii
	M. laidlawi	Secreții genitale, respiratorii
Ovine caprine	M. agalactiae	Agalaxia contagioasă
	M. mycoides var. caprae	Pleuropneumonia contagioasă a caprelor
Suine	M. hyorhinis	Poliartrite
	M. granularum	Artrite
	M. hyopneumoniae	Pneumonia enzootică
	M. hyogenitalium	Mamite
	M. hyoarthrinosa	Artrite
Păsări	M. gallisepticum	Micoplasmoza respiratorie aviară
	M. gallinarum	Epifit al căilor respiratorii
	M. meleagridis	Aerosaculita curcilor
	M. sinoviae	Polisinovita infecțioasă
Canine	M. spumans	Infecții secundare în jigodie
	M. canis	Idem
	M. maculosum	Idem
Șoareci Șobolani	M. pulmonis	Pneumonia enzootică a murinelor
	M. neurolyticum	Infecția sistemului nervos la șoareci
	M. arthritidis	Artrite la șobolani

În examinarea micoplasmelor se folosesc o serie de metode de laborator, dintre care cele mai importante sînt descrise mai departe.

1 – Examenul microscopic

Are o valoare semnificativă în special pentru cercetarea caracterelor morfologice în culturi, deoarece punerea în evidență a germenilor din produsele patologice este dificilă și nu oferă date importante pentru diagnostic.

Principalele metode ce se folosesc pentru colorarea frotiurilor sînt metoda Giemsa și Wroblewski.

Metoda Giemsa — se acoperă frotiul cu soluția Giemsa diluată (3 picături soluție Giemsa concentrată la 2 ml apă bidistilată) și se ține 30—60 minute.

— se varsă colorantul și se spală cu apă distilată.

Metoda Wroblewski — frotiurile se fixează în vapori de acid osmic, după care

— se face mordansarea timp de 10 minute într-o soluție compusă din:

— tanin	2,0 g
— sulfat de zinc	1,0 g
— apă distilată	100,0 ml

— spălare intensă cu apă

— colorare timp de 3—5 minute cu soluție de fucsină Ziehl.

Micoplasmele se colorează și prin metoda Gram-dublu apărînd Gram negative. Din punct de vedere morfologic, ele apar ca niște formațiuni cocoide, foarte mici (0,3—0,6 microni) colorate în roșu, de aspect polimorf (sferoide, inelare, romboidale sau filamentoase). Polimorfismul cel mai pronunțat apare în frotiuri din medii lichide.

În culturile mai vechi, formele filamentoase dispar, în frotiuri predominînd formele cocoide. Prin supracolorare, în culturi proaspete se pot pune în evidență și formațiuni globuloase, mari, amintind celula unor drojdii.

2 – Examenul cultural

Cultivarea micoplasmelor este destul de dificilă, dacă nu se îndeplinesc anumite exigențe care să permită dezvoltarea pe mediile de cultură artificiale. Bune rezultate se obțin prin folosirea următoarelor medii:

Mediul Edward compus din:

— bulion de cord de bou	1 000,0 ml
— acetat de taliu	0,5 g

În momentul întrebuințării se adaugă 100 U.I. penicilină la 1 ml mediu și 20% ser de cal normal. Adăugarea în proporție de 2% a agarului permite obținerea unui mediu solid.

Mediul Riegler-Stamatin

— fibre de agar	0,5 g
— bulion	100,0 ml
— ser de cal sau bou	10,0 ml

pH-ul mediului se ajustează la 7,7

Mediul Newing

— extract de carne de bou	2,0
— peptonă	10,0 g
— ser de cal sau bou	10,0 ml
— extract de drojdie	10,0 g
— glucoză	0,1 g
— apă distilată	100,0 ml

pH-ul se ajustează la 7,4

Sterilizarea are loc prin filtrare direct în vasele de cultivare; pentru a înlătura contaminările, se poate adăuga acetat de taliu și penicilină.

Bulionul infuzie-cord se prepară din 453 g cord de cal sau bou, fragmentat și pus la macerat la rece, peste noapte, într-un litru de apă. Se ține sub vapori de apă 2 ore, se ajustează pH-ul la 8,4, se filtrează, se reajustează pH-ul la 7,8, după care se adaugă 10,0 g peptonă, 5,0 g extract de carne, 5,0 g mucină gastrică de porc, 5,0 g NaCl și se aduce volumul la 1 litru. Apoi se autoclavează și se repartizează, în flacoane sau tuburi, în cantități convenabile.

Agarul infuzie-cord se prepară din bulionul infuzie de cord, la care se adaugă 20,0 g agar. Se ajustează pH-ul la 7,6 și se filtrează la cald (în autoclavul cu capacul deschis). Pentru laboratoarele mici este bine să se repartizeze în cantități mici de 16 ml în tuburi cu dop înșurubat. Înainte de folosire se adaugă 20% ser de cal și 10% extract de drojdie (după ce agarul a fost topit și răcit la 50°C).

Bulionul PPLO Difco este identic cu bulionul infuzie de cord, doar că se adaugă 20% ser de cal (sau alt ser) inactivat. Pentru a fi selectiv se poate adăuga 300 U.I./ml penicilină și acetat de taliu în proporție finală de 1/4000.

Mediul White se folosește în special pentru izolarea din materialele contaminate. Se compune din:

— bulion de carne	1 000,0 ml
— ser normal de cal sau bou	100,0 ml
— acetat de taliu	1,0 g
— sulfametazină	0,20 g
— cristal violet	0,001 g

pH-ul se ajustează la 7,6—7,8

Temperatura optimă de dezvoltare este de 36—38°C timp de 2—10 zile.

Se însămînțează în mod obișnuit atît medii lichide cît și solide. Incubația se face timp de 3—7 zile la 37°C. Unele tulpini se dezvoltă mai bine în exicator.

Aspectul cultural este, în general, similar pentru toate speciile, variațiile semnalîndu-se în special în legătură cu condițiile de cultivare.

În mediile lichide, micoplasmele produc o turbiditate discretă, decelabilă în special dacă se compară cu un mediu neînsămînțat. Controlul dezvoltării se face mai ușor dacă se adaugă mediului glucoză și un indicator de pH (dacă se folosește roșu fenol dezvoltarea este indicată de virarea culorii spre galben).

Pe mediile solide, pentru o mai bună observare a aspectelor culturale, se recurge la examinarea coloniilor la microscop, cu un obiectiv mic sau la lupă. Se pot distinge, în acest fel, 3 tipuri de colonii:

— colonii de tip T (thin), mici, cu diametrul de 10—20 microni, ușor bombate, rotunde, dense;

— colonii mijlocii, bombate, cu centrul granular și o zonă marginală îngustă, abia vizibilă; după 6 zile de incubație pot atinge dimensiunile de 100 microni diametru;

— colonii butonate, mamelonate mari, formate din două zone distincte, una centrală, opacă, densă și alta marginală, transparentă.

Coloniile sînt foarte aderente la mediu. Dacă se încearcă raclarea cu ansa, centrul coloniei rămîne inclus în mediu.

Aspectul morfologic al coloniilor se poate examina și prin:

— *examinare la microscopul cu contrast de fază.* În acest scop se secționează un strat foarte subțire de agar, cu colonia de examinat (cu ajutorul unei lame de ras), se pune pe lamă, se acoperă și se presează ușor cu o lamelă și se examinează cu obiectivul 60. Examinarea în acest fel relevă structura fin granulată a coloniilor;

— *colorarea cu acridin oranj.* În acest scop se scoate un strat de agar cu colonii caracteristice (cca 1 cm^2) și se așază pe o lamă cu partea pe care se găsesc coloniile lipită pe lamă. Lama se introduce apoi în poziție înclinată (45°) într-un pahar cu apă la 80°C și se ridică brusc temperatura pînă aproape de fierbere. După topirea agarului, lama se spală ușor cu apă distilată. Coloniile se colorează apoi timp de 5 minute cu o soluție 0,1% acridin oranj.

La examenul microscopic, în lumina ultravioletă, coloniile prezintă o fluorescență roșie-strălucitoare;

— *colorarea prin metoda Dienes.* În acest scop, blocul cu agar cu coloniile suspecte se așază pe o lamă de microscop și se colorează timp de 2 minute cu o soluție compusă din:

— albastru de metilen	2,5 g
— Azur II	1,25 g
— maltoză	10,0 g
— carbonat de sodiu	0,25 g
— acid benzoic	0,2 g
— apă distilată ad	100,0 ml

Urmează spălarea cu apă, uscarea și examinarea.

Stabilirea apartenenței de specie se face prin corelarea cu specia de la care micoplasmele respective au fost izolate și prin efectuarea unor teste de tipizare.

3 – Examene biochimice

Oferă date utile pentru unele specii. Astfel spectrul zaharolitic este diferit în funcție de specie:

— *M. mycoides:* fermentează glucoza, maltoza, manoza, fructoza,

dextroza și amidonul și în măsură redusă, cu acidifiere în cazul galactozei, xilozei, zaharozei, trehalozei; alte hidrocarbonate nu sînt scindate;

— *M. bovigenitalium:* nu fermentează hidrocarbonatele uzuale;

— *M. agalactiae:* fermentează lactoza, manita, eritrita;

— *M. mycoides* var. *caprae:* fermentează glucoza, zaharoza, maltoza, manoza, dextrina, glicogenul, nu fermentează galactoza, lactoza, salicina, manitolul, dulcita;

— *M. hyorhinis:* fermentează lactoza, zaharoza, glucoza, manita, maltoza;

— *M. gallisepticum:* fermentează dextroza, maltoza, galactoza, trehaloza, levuloza, manoza, dextrina, amidonul, xiloza; fermentează slab zaharoza și manitolul și nu fermentează lactoza, dulcitolul și salicina;

— *M. gallinarum:* nu fermentează hidrații de carbon uzuali;

— *M. sinoviae:* fermentează dextroza și maltoza, nu fermentează lactoza, zaharoza, manitolul;

— *M. meleagridis:* nu fermentează glucoza și dextroza.

Alte teste biochimice:

— testul de reducere a C.T.T. (clorura de trifeniltetrazolium) se face prin cultivarea pe medii conținînd 0,5% clorură de trifeniltetrazolium. Examinarea zilnică, timp de 6 zile, permite constatarea unor reacții pozitive (modificarea culorii în roșu) sau negative (mediul rămîne neschimbat);

— testul cu benzidină: tulpinile se însămînțează pe geloză cu ser de cal, la care se adaugă 4% globule roșii de oaie și 0,01% soluție apoasă de benzidină. Reacția pozitivă se traduce prin colorarea în brun-roșcat a coloniilor;

— testul peroxidazei este mai puțin semnificativ.

4 – Examenul capacității hemolitice

Se face prin cultivarea timp de 3 zile la 37°C pe medii cu sînge 5% (agar PPLO). Micoplasmele patogene, mai ales, au capacitatea de a produce hemoliza de tip beta (*M. gallisepticum, M. meleagridis, M. mycoides, M. agalactiae* etc.).

5 – Examene serologice

Vizează pe de o parte depistarea anticorpilor specifici în sîngele animalelor suspecte și pe de alta, identificarea pe baza unor seruri cunoscute, a tulpinilor de micoplasme izolate din infecțiile spontane.

a) Pentru depistarea anticorpilor specifici în sîngele animalelor suspecte se poate folosi reacția de hemoaglutinare.

— **Reacția de hemoaglutinare** se folosește în lucrările de precizare a infecției cu *M. gallisepticum* la păsările vii. Pentru efectuarea reacției este nevoie în primul rînd de un antigen micoplasmic corespunzător. În acest scop, culturi ale acestui germen pe mediu lichid se supun centrifugării. Sedimentul se spală de 3 ori cu soluție fiziologică după care se suspendă în soluție fiziologică cu adaos 1,5% din citrat de sodiu, 1 picătură de soluție de cristal violet 1% la fiecare 5 ml și mertiolat de sodiu 1/10 000. Volumul de soluție fiziologică, în care se suspendă, trebuie să

fie de 100 de ori mai mic decît al bulionului din care provin micoplasmele. Suspensia obţinută în acest fel reprezintă antigenul micoplasmic.

Pentru efectuarea reacţiei se pune o picătură de sînge obţinut prin puncţie venoasă sau secţionarea crestei, pe o lamă de microscop căreia i se adaugă imediat o picătură de antigen omogenizat în prealabil. Se amestecă prin înclinări repetate ale lamei, eventual se încălzeşte uşor şi după cca 3 minute se citeşte reacţia. În caz pozitiv, se produce aglutinarea corpilor micoplasmici sub forma de flocoane albe-cenuşii.

b) Pentru a identifica tulpinile de micoplasma izolate din infecţiile spontane se pot practica următoarele reacţii: reacţia de aglutinare a globulelor roşii spălate (hemaglutinare), reacţia de inhibare a hemaglutinării.

— **Reacţia de hemaglutinare** are la bază proprietatea micoplasmelor patogene de a aglutina globulele roşii de pasăre normală. Pentru efectuarea reacţiei este nevoie de antigen micoplasmic şi o suspensie 2‰ de globule roşii de găină.

Antigenul micoplasmic se obţine din culturi în bulion, centrifugate şi spălate succesiv, de 3 ori, cu soluţie fiziologică tamponată sterilă.

Suspensia de globule roşii se prepară în proporţie de 2‰. Pentru aceasta sîngele se recoltează pe lichid Alsever, se centrifughează 15 minute la 1500 t/minut, eliminîndu-se supernatantul. Sedimentul eritrocitar se spală de 3 ori cu soluţie fiziologică, în final realizîndu-se o suspensie de 2‰.

Pentru efectuarea reacţiei se pun în contact diluţii crescînde de antigen micoplasmic (începînd cu 1/2) cu cantităţi constante de suspensie de globule roşii (0,5 ml), în tuburi de reacţie şi se pun la baie de 37°C, timp de 20 de minute. Dacă suspensia micoplasmică are însuşiri hemaglutinante, se va observa apariţia fenomenului de aglutinare, de intensităţi proporţionale cu concentraţia antigenului micoplasmic.

— **Reacţia de inhibare a hemaglutinării** are la bază inhibarea capacităţii hemaglutinante a suspensiei de micoplasme de către anticorpii specifici conţinuţi de un ser corespunzător. Pentru efectuarea reacţiei, antigenul micoplasmic trebuie să aibă un titru aglutinant de cel puţin 1/10 (dacă titrul hemaglutinant este sub 1/10 el trebuie concentrat).

Reacţia propriu-zisă constă în punerea în contact a serului specific cu antigenul la 37°C timp de 20 minute (cîte 0,5 ml din ser şi antigen, în diluţii corespondente). Se adaugă apoi suspensia de eritrocite (0,5 ml) şi se pune din nou 20 minute la 37°C.

Reacţia pozitivă constă în sedimentarea eritrocitelor, cu un aspect asemănător cu martorul pozitiv (antigen + suspensie eritrocitară) dînd imaginea unei calote compacte de cca 2 mm diametru.

Reacţia negativă constă în apariţia hemaglutinării, sub forma unui strat subţire, cu marginile franjurate, acoperind aproape tot fundul eprubetei.

Tot o reacţie de tipizare serologică este şi *inhibarea dezvoltării micoplasmelor pe medii de cultură,* prin folosirea de antiseruri specifice. După o tehnică simplă, se însămînţează din culturi în bulion, plăci cu medii nutritive solide, după care se zvîntă 20—30 minute la termostat şi se aplică discuri îmbibate cu antiseruri cunoscute. Interpretarea constă în observarea existenţei în jurul discurilor a zonelor de inhibiţie a dezvoltării micoplasmelor.

Se pare că inhibarea creşterii prin anticorpi specifici este cea mai sensibilă metodă de identificare. Ea se poate folosi nu numai în identificarea tulpinilor de micoplasme izolate ci şi în determinarea anticorpilor din serul animalelor din focare de boală (în acest caz se lucrează cu antigene micoplasmice cunoscute).

Se mai pot folosi şi *reacţiile de hemadsorbţie şi inhibare a hemadsorbţiei*. Se ştie că globulele roşii ale diverselor specii pot fi adsorbite pe suprafaţa coloniilor de micoplasme. Dacă coloniile sînt tratate în prealabil cu seruri specifice corespunzătoare fenomenul de adsorbţie nu mai are loc. Reacţiile se execută în godeurile unor plăci de material plastic. Pe fundul godeurilor, se repartizează o cantitate de 0,1 ml geloză PPLO. Mediul se însămînţează, astfel ca după incubare să rezulte 5—20 colonii.

În cazul reacţiei de hemadsorbţie, se adaugă peste colonii, 0,025 ml suspensie de globule roşii 0,5% şi se incubează timp de 30 de minute la 37°C. Apoi placa se spală cu soluţie fiziologică tamponată şi se examinează la microscop. Coloniile vor apărea, în caz pozitiv, tapisate cu globule roşii.

În cazul inhibării hemadsorbţiei, peste colonii, se pun întîi 0,025 ml ser specific (eventual în diferite diluţii). După 30 de minute de contact, la temperatura camerei, se adaugă cîte 0,025 ml suspensie de globule roşii 0,5%. Se incubează 30 de minute la 37°C, după care placa se spală cu soluţie fiziologică. În cazul reacţiei pozitive (inhibarea hemadsorbţiei) coloniile nu trebuie să fie acoperite cu hematii.

6 – Inoculări experimentale

În acest scop se folosesc în special ouăle embrionate. Inocularea pe cale intravitelină sau în camera alantoidiană produce moartea embrionilor după 4—6 zile, cu fenomene hiperemice cutanate şi viscerale. La unii din ei şi mai ales la cei care mor după 6—7 zile de la infecţie, se constată aproape constant pericardită.

7 – Izolarea şi cultivarea micoplasmelor pe culturi celulare

Se folosesc culturi omoloage speciei animale de la care se izolează tulpina. Prin multiplicare, unele tulpini produc efect citopatic, în timp ce altele nu determină modificări celulare evidente. Controlul prezenţei micoplasmelor în aceste culturi celulare se face prin reînsămînţări pe agar PPLO.

8 – Examenul histopatologic

Serveşte pentru diagnosticul infecţiilor micoplasmice la păsări, în care se produc o serie de modificări tisulare cu o importantă valoare diagnostică.

Drept materiale patologice se folosesc porţiuni de mucoasă, recoltate de la nivelul căilor respiratorii (sinusuri, mucoasă nazală, traheală) sau, mai puţin indicat, ţesut pulmonar. Prelucrarea acestora, după tehnicile obişnuite (în stare proaspătă, prin secţionare la gheaţă sau în stare fixată, prin incluzie în parafină) permite obţinerea de secţiuni în care se pot identifica, la examenul microscopic, modificări cu o semnificaţie diagnostică importantă: hiperplazia mucoasei, cu pierderea cililor vibratili ai epiteliului de acoperire, infiltraţie monocitară difuză sau în focare şi hiperplazia glandelor epiteliale sub formă de amforă. În pulmon şi sacii aerieni, se găsesc focare de infiltraţie limfocitară, granuloame cu celule gigante.



Metode şi tehnici de laborator pentru diagnosticul micozelor

Micozele sînt boli produse prin localizarea şi multiplicarea la nivelul ţesuturilor a unor specii de ciuperci patogene sau condiţionat patogene, ele putînd fi întîlnite atît la animale cît şi la om.

În funcţie de localizarea miceţilor, se deosebesc două categorii de micoze: superficiale sau cutanate (dermatomicoze) şi profunde, respectiv micozele viscerale.

Precizarea naturii micotice a unei boli şi mai ales identificarea speciei care a produs-o se pot face numai cu ajutorul unor metode de laborator, dintre care o importanţă majoră prezintă:

— examenul macroscopic, examenul microscopic, examenul cultural, testele biochimice, examenul histopatologic, testarea patogenităţii prin inoculări experimentale.

Recoltarea, ambalarea, conservarea şi transportul materialului patologic în vederea examenului micologic de laborator

Dată fiind transmisibilitatea bolilor micotice, manevrarea produselor patologice, începînd cu recoltarea şi continuînd cu ambalarea, transportul şi prelucrarea lor, se va face în condiţii de sterilitate perfectă şi cu multă atenţie.

Pe de altă parte, este important să se lucreze steril (condiţie ce se referă inclusiv la instrumentarul şi ustensilele de laborator folosite) şi cu scopul de a se preveni contaminarea cu alţi germeni a materialului patologic şi a mediilor de cultură.

Legat de aceste aspecte, trebuie menţionat faptul că folosirea antisepticelor antibacteriene este ineficientă în cazul de faţă, datorită rezistenţei mari pe care fungii o manifestă faţă de acestea. Ca urmare, sterilizarea se va face prin mijloace termice (flambare, autoclavare etc.).

Ca materiale patologice pentru diagnosticul de laborator al micozelor, se pot folosi: cruste, scvame, fire de păr, pene, exsudate, membrane, secreţii fluide şi semifluide, noduli, urină, lapte, sînge, fragmente de ţesuturi şi organe etc. recoltate, după caz, de la animale bolnave sau cadavre. Alegerea unora sau altora din aceste materiale se face în funcţie de datele anamnetice, clinice, anatomopatologice.

În funcție de natura materialului patologic, se recomandă ca recoltarea să se facă astfel:

— firele de păr se recoltează prin smulgere cu pensa din zona marginală a leziunii (firele lipsite de luciu, decolorate, casante); ele se transportă în eprubete sau plăci Petri sterile, eventual între două lame;

— scvamele se recoltează cu o pensă sterilă, prin raclare cu un bisturiu steril sau cu ajutorul unor tampoane sterile îmbibate în prealabil în ser fiziologic steril. Ambalarea în vederea transportării lor la laborator se face în același mod ca și pentru firele de păr;

— exsudatele, secrețiile fluide și semifluide se recoltează cu pipete Pasteur sau cu ajutorul unor tampoane sterile și se introduc în eprubete sterile;

— secrețiile consistente (noduli sau grunji) se recoltează cu pense sterile, evitîndu-se strivirea lor; se transportă în eprubete sterile;

— lichidele de puncție se recoltează cu pipeta Pasteur sau seringi sterile;

— urina de la animale bolnave se recoltează cu un cateter în eprubete sterile, iar de la cadavre cu seringi sterile;

— secrețiile nazale, bucale, vaginale, de la animalele vii se recoltează cu tampoane sterile care se introduc apoi în eprubete cu ser fiziologic steril;

— materiile fecale se recoltează cu tampoane care se introduc în eprubete ce conțin soluție fiziologică cu adaos de antibiotice (500—5000 U.I. penicilină/ml);

— laptele se recoltează în eprubete sterile, din fiecare sfert, după ce în prealabil s-au făcut spălarea și dezinfectarea mameloanelor;

— fragmentele de țesuturi sau organe cu leziuni se recoltează cu ajutorul unor foarfeci sau bisturie sterile.

În ceea ce privește conservarea și transportul probelor la laborator este recomandabil ca acestea să se facă în condiții de umiditate și temperatură scăzută și într-un timp cît mai scurt posibil (probele de lapte trebuie să ajungă la laborator în maximum 5 ore de la recoltare).

1 – Examenul macroscopic

Examenul macroscopic al leziunilor oferă date pur orientative pentru diagnosticul micozelor cutanate și viscerale.

În cazul dermatomicozelor, se iau în considerare: localizarea, forma și dimensiunile placardelor, caracterul lor circumscris sau confluent, prezența și aspectul crustelor, aspectul firelor de păr (fără luciu, decolorate, casante, pseudotunderea).

În cazul micozelor viscerale, leziunile sînt foarte variate (ulcerații, microabcese, formațiuni necrotice nodulare, pseudomembrane etc.), nespecifice și cu multiple localizări.

Ca urmare, acest prim examen trebuie însoțit în mod obligatoriu, în ambele cazuri, de celelalte mijloace de investigație de laborator (examenul microscopic, cultural, histopatologic, biochimic), care dau posibilitatea precizării etiologiei bolii în cauză.

2 – Examenul microscopic direct

Examenul microscopic direct oferă date cu privire la prezența sau absența micetelor în materialul patologic, fiind ușor și rapid de executat. Are însă o valoare limitată în ceea ce privește identificarea ca gen sau specie a fungilor.

Pentru a asigura o bună evidențiere a elementelor fungice în preparatele microscopice native, materialul patologic se va trata în prealabil cu o soluție disociantă (clarificantă) care are totodată și rol de protecție a examinatorului, prin acțiunea fungicidă (fixatoare) de care dispune. Se pot folosi în acest scop:

— hidratul de sodiu sau de potasiu în concentrație de 10—30%
— cloral-lactofenolul care se prepară din:

— cloral hidrat cristalin	20,0 g
— fenol cristalin	10,0 g
— acid lactic	10,0 g

— lactofenolul Amann, compus din:

fenol cristalin	10,0 g
acid lactic	10,0 g
glicerină	20,0 g
apă distilată	10,0 ml

La acest amestec se poate adăuga un colorant specific pentru fungi blau-cotton (în proporție de 0,5%).

— sulfura de sodiu în soluție hidroalcoolică 10%, compusă din:

— sulfură de sodiu	1,0 g
— alcool pur	2,5 ml
— apă distilată	7,5 ml

Se păstrează în sticle de culoare închisă, la adăpost de lumină, timp de cca 3—4 săptămîni.

Tehnica de lucru. În cazul materialelor patologice fluide și semi-fluide, se etalează pe o lamă curată o picătură de clarificant (lactofenol, KOH, NaOH), peste care se pune o cantitate foarte mică din materialul de examinat. Se acoperă cu o lamelă fină, avînd grijă să nu se formeze bule de aer și se examinează la microscop cu obiectivul 20 × sau 40 × și ocular 10.

În cazul materialelor patologice cu o consistență mai mare (cruste, fire de păr, scvame etc.) este necesar să se folosească pentru clarificare, o soluție disociantă mai puternică cum este sulfura de sodiu 10%, KOH sau NaOH în concentrație de 10—30%, din care se etalează cîteva picături pe lamă; se pun apoi cîteva fragmente din materialul de examinat, se aplică lamela și se examinează imediat, în cazul în care s-a folosit sulfura de sodiu, sau după 20—30 minute dacă s-a folosit KOH sau NaOH. Timpul de disociere poate fi redus în cazul ultimelor soluții prin încălzirea ușoară a lamelor la flacără (fără să fiarbă).

Dacă totuși rezultatul nu este satisfăctor, se poate recurge la un alt procedeu și anume: într-o eprubetă în care s-a pus materialul de examinat se adaugă hidrat de potasiu 30%, se amestecă bine pentru a activa disocierea, după care se diluează cu apă distilată și se centrifughează. Din sedimentul ce se obține, se fac preparate microscopice, folosind lamele fine care să permită examinarea cu un obiectiv mare.

Metode de colorare a miceţilor în frotiuri. Vizualizarea elementelor fungice în preparatele microscopice efectuate direct din materialul patologic poate fi facilitată şi prin folosirea unor metode de colorare, care oferă în acelaşi timp şi avantajul obţinerii unor preparate imperisabile, cu o durată mare de conservabilitate.

Metoda Hotckkiss—McManus. *Tehnica de lucru.* Se disociază materialul patologic (în special produsele cornoase: peri, scvame, cruste) cu potasă caustică, se fragmentează în porţiuni mici şi se depune pe lame bine degresate şi unse cu gelatină sau albumină Mayer. Preparatele astfel obţinute se usucă la etuvă la 55°C timp de 2 minute, după care:

— se fixează în alcool 70° timp de 2 minute
— se spală cu apă distilată
— se introduc într-o baie conţinînd soluţie apoasă 1% de acid periodic, unde se ţin 5 minute
— spălare cu apă de robinet timp de 2 minute
— tratare cu reactiv Schiff timp de 10 minute
— se trec apoi preparatele succesiv prin 3 băi cu apă sulfuroasă, cîte 5 minute în fiecare baie
— spălare cu apă distilată şi alcool 95°, timp de 2 minute
— deshidratare în alcool absolut, timp de 2 minute
— clarificare în xilol — 2 minute
— montarea în balsam de Canada.

În urma acestei colorări, formaţiunile micotice apar de culoare vişinie-intensă, putîndu-se observa foarte bine filamentele miceliene, artrosporii, organele de fructificare, celulele levurice.

Această metodă se pretează foarte bine şi pentru colorarea miceţilor în fragmente de ţesuturi obţinute prin biopsie. În acest caz, ţesutul parazitat prezintă o culoare liliachie, pe fondul căreia se observă formaţiunile micotice colorate în vişiniu-intens.

Colorarea rapidă pentru dermatofiţi (după Schwartz şi Lamkins) foloseşte un amestec format din o parte soluţie KOH 10% + o parte soluţie umectantă (obţinută prin dizolvarea în 100 ml apă distilată a 0,15 g benzoat de sodiu şi 0,85 g dioctyl sodium sulfocinat) + 2 părţi cerneală persistentă albastră-neagră. Acest colorant se poate păstra în condiţii bune timp de 2 luni.

Tehnica de lucru este extrem de simplă. Pe o lamă curată se aşază cîteva fragmente de fire de păr sau scvame împreună cu o picătură din colorantul menţionat; se acoperă cu o lamelă fină şi se încălzeşte uşor la flacără. Se presează apoi lamela cu multă grijă pentru eliminarea excesului de colorant şi se examinează la microscop. Elementele fungice apar colorate în albastru.

Identificarea fungilor în preparatele microscopice efectuate direct din materialul patologic se face pe baza următoarelor criterii morfologice:

— genul *Trichophyton,* tipul microid, este caracterizat prin spori de dimensiuni mici (2—3 microni diametru), dispuşi uneori în lanţuri ce formează manşoane în jurul firelor de păr; filamentele miceliene se dezvoltă în interiorul firului de păr (tip de parazitare mixtă ecto-endotrix); tipul megaspor prezintă spori de dimensiuni mai mari (4—6 microni), avînd acelaşi mod de parazitare ecto-endotrix;

— genul *Microsporum* prezintă spori de dimensiuni mici (2 microni

diametru), sferici, formînd un manşon în jurul firelor de păr, filamentele miceliene se dezvoltă în interiorul firelor de păr;

— genul *Aspergillus* are miceliul format din hife septate, ramificate, conidioforii pornind dintr-o celulă bazală; distal, prezintă o columelă de pe suprafaţa căreia pornesc lanţuri de conidii prinse prin sterigme; conidiile au 2—3 microni diametru şi pot fi de culoare brună, verde sau neagră;

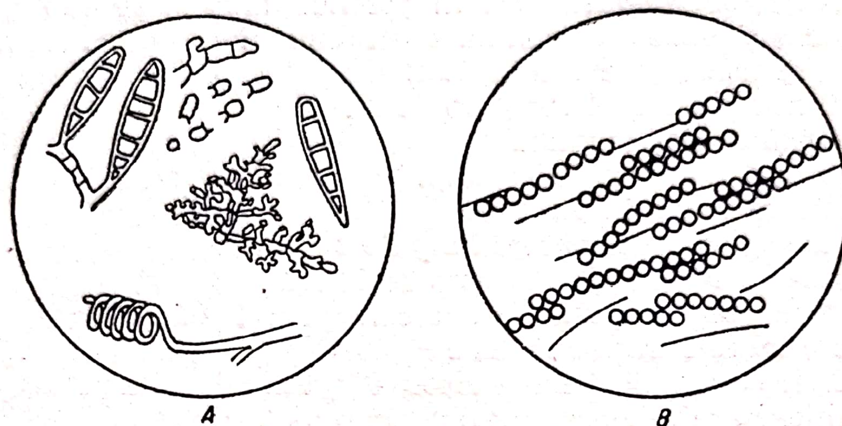


Fig. 147 — Trichophyton mentagrophytes
A — in vitro; B — in vivo

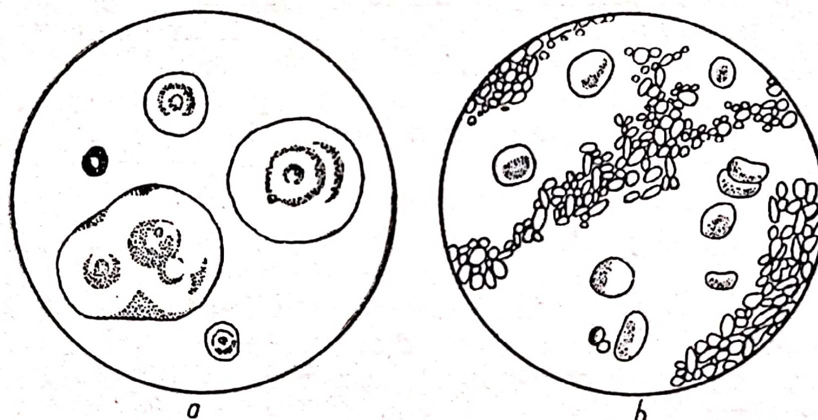


Fig. 148 — Cryptococcus neoformans
a — in vitro; b — in vivo

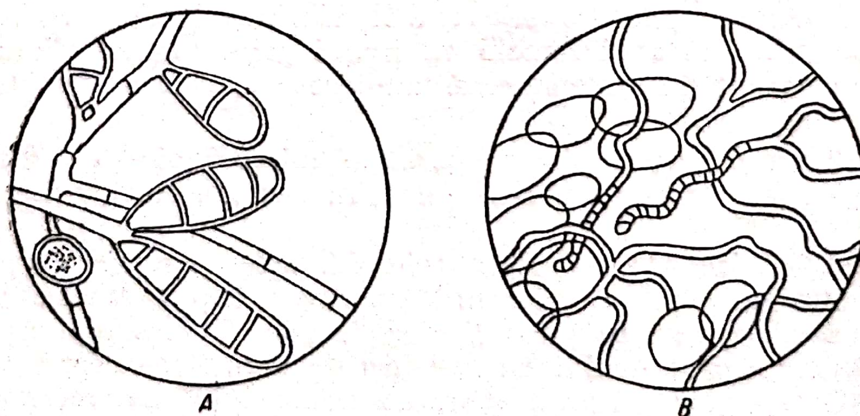


Fig. 149 — Epidermophyton floccosum
A — in vitro; B — in vivo

— genul *Candida* este caracterizat prin celule sferice, ovoide uneori pseudomicelii formate din celule alungite, unite cap la cap, avînd diametrul de 2—5 microni;

— genul *Geotrichum* prezintă celule cilindrice, ovoide, cu lungimea de 6—10 microni;

— genul *Torulopsis* prezintă celule sferice sau ovale, cu muguri numeroşi, cu diametrul de 2—5 microni;

— genul *Cryptococcus* prezintă celule ovale, sferice, cu dimensiuni de 5—20 microni, cu capsulă gelatinoasă; pot exista şi celule înmugurite, fără capsulă;

— genul *Nocardia* prezintă forme bacilare fine şi filamente fine, ramificate neregulat;

— genul *Actinomyces* prezintă filamente ramificate, fine, în rozetă, cu diametrul de 1 micron;

— genul *Hystoplasma* este caracterizat prin filamente subţiri, cu diametrul de 2,5 microni, chlamidospori prinşi cu un pedicul, cu blastospori unipolari, sferici, avînd 2—4 microni diametru;

— genul *Coccidioides* este caracterizat prin miceliu septat, ramificat, dilatat din loc în loc sub formă de rachetă;

— genul *Penicillium* prezintă un miceliu septat, incolor, din care pleacă conidioforul, despărţit de miceliu printr-un sept distal; conidioforii sînt ramificaţi, conidiile sînt dispuse în lanţ prinse de sterigme; spori mici, sferici, verzui;

— genul *Mucor* este caracterizat prin hife neseptate, sporangiofori simpli sau ramificaţi, terminaţi cu o veziculă (columela) sferică, piriformă sau cilindrică, plină cu spori sferici, muriformi şi netezi; nu prezintă rhizoizi;

— genul *Absidia* — sporangioforii pornesc din porţiunile internodale, columela veziculară este plină cu spori incolori;

— genul *Rhizopus* — sporangioforii pornesc din acelaşi loc cu rhizoizii, formînd noduri; columela emisferică este aşezată pe o apofiză; sporangii sînt de culoare neagră;

— genul *Sporotrichum* prezintă un miceliu subţire, ramificat, conidioforii sînt scurţi, cu conidii piriforme izolate sau în mănunchi, ovale, rotunde, cilindrice, situate în vîrf sau lateral;

— genul *Scopulariopsis* prezintă hife, conidiofori ramificaţi, neregulaţi, cu conidii dispuse în lanţ, legate prin sterigme; conidiile pot fi brune, galbene, echinulate;

— genul *Alternaria* prezintă micelii scurte, septate, conidiofori simpli sau ramificaţi, groşi, de culoare neagră, cu conidii alungite, dispuse în lanţ, negre; conidiile prezintă septuri transversale şi longitudinale cu aspect de mură;

— genul *Trichothecium* are hife septate, conidiofori simpli, conidiile eliptice, incolore, sub formă de sferule dispuse în mănunchi;

— genul *Chladosporium* este caracterizat prin hife brune, septate, conidioforii poartă conidii aşezate în formă de coroană de copac; conidiile pot fi uni- şi bicelulare, cilindrice, cu capetele rotunjite;

— genul *Helmintosporium* are hife septate, brune, conidiofori scurţi, conidii pluricelulare, septate transversal, dispuse grupat sau solitar, de culoare neagră.

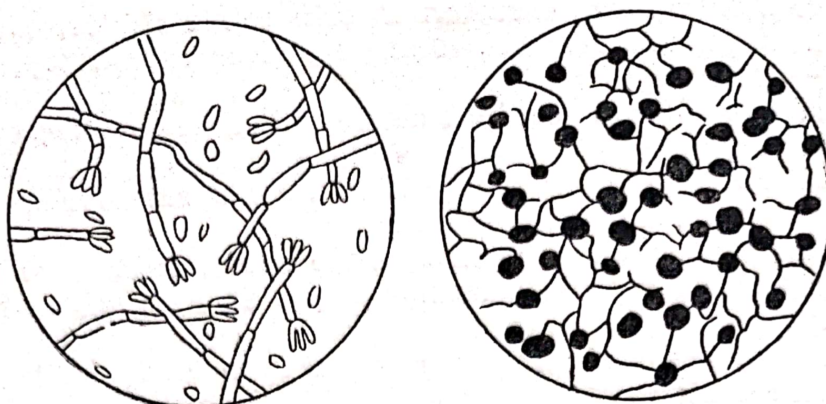


Fig. 150 — Stahybotrys alternans

Trebuie menţionat faptul că ciupercile din genurile *Penicillium, Alternaria, Trichothecium, Scopulariopsis, Chladosporium, Helmintosporium,* nu sînt citate ca agenţi patogeni ai micozelor viscerale, ci ca fungi contaminanţi ce apar foarte frecvent în laboratoare. Cunoaşterea lor însă este foarte importantă pentru stabilirea corectă a unui diagnostic micologic.

Tot în scopul evitării eventualelor erori de diagnostic, examinatorul trebuie să aibă în vedere prezenţa în preparatele microscopice a unor artefacte cum sînt:

— „mozaicul fungic“ sau fungii falşi — (se deosebesc de miceliile adevărate prin faptul că au diametrul neuniform, sînt dispuse în mod ne-

	Candida	Geotrichum	Cryptococcus	Saccharomyces
Examen direct	Levuri burjeonante rotunde 2-4 μ ovalare; Filamente miceliene	Artrospori rectangulari; Artrospori ovalari	Levuri ± capsulate 5-20 μ	Levuri
Culturi	Levuri; Chlamydospori de C. albicans; Filamente pe medii de cultură	Filamente fragmentate		Levuri ascosporulate; Asce; Medii speciale

Fig. 151 — Candida, Geotrichum, Cryptococcus, Saccharomyces (examen direct şi culturi)

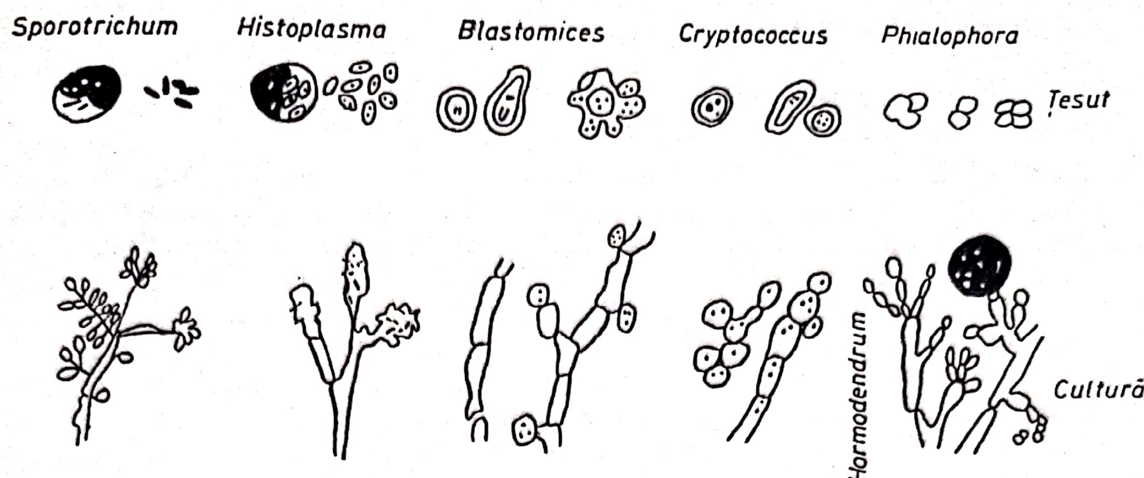


Fig. 152 — Diferențierea cîtorva specii de ciuperci patogene (după Hallmann)

regulat și au marginile zimțate; apar mai frecvent în preparatele native efectuate din cruste tricofitice);

— granulele de cheratină, fibrele elastice, vacuolele de aer, cristalele de substanțe alcaline rezultate în urma supraîncălzirii lamelor (aceste cristale au margini poliedrice, sînt dispuse neregulat și sînt foarte transparente);

— picături de grăsimi ce se pot confunda cu celulele levurice și conidiile; se deosebesc de acestea prin faptul că au o membrană dublă, sînt refringente și dispuse în mod neuniform.

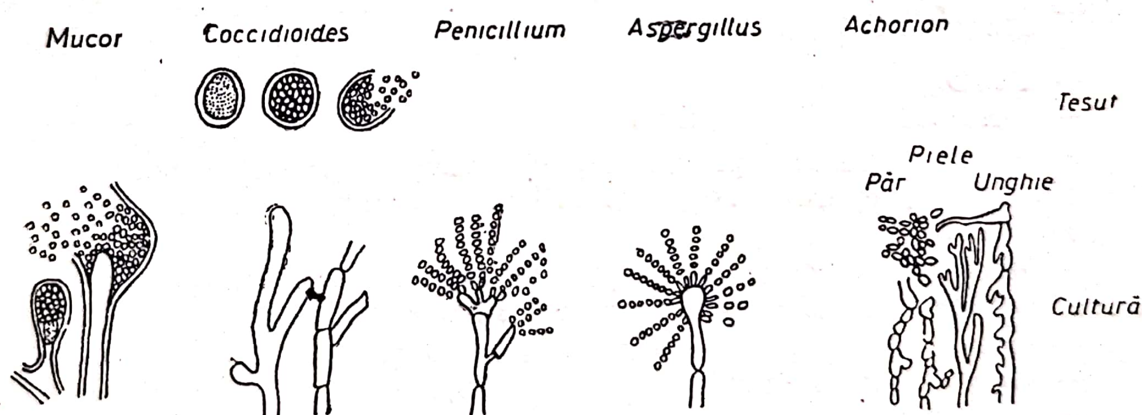


Fig. 153 — Diferențierea unor ciuperci prin aparatul de fructificare (după Hallmann)

3 – Examenul cultural

Constituie alături de examenul microscopic direct, o probă obligatorie de diagnostic, fiind de un real ajutor în încadrarea în familie, gen și chiar specie a ciupercii examinate. El constă în însămînțarea materialului patologic pe medii de cultură special destinate acestui scop.

Mediul Sabouraud solid este un mediu de bază utilizat pentru cultivarea fungilor filamentoși, a fungilor levuriformi și a dermatofiților. Se compune din:

— agar 20,0 g
— peptonă 10,0 g
— glucoză sau maltoză 40,0 g
— apă distilată 1 000,0 ml

Se dizolvă peptona și glucoza (sau maltoza) într-un balon cu fund plat, după care se adaugă agarul și se încălzește încet la autoclav pînă la 115—120°C; se lasă apoi să coboare temperatura la cca 100°C și se filtrează repede la cald, prin vată hidrofilă. Se repartizează în recipiente, după necesități, și se sterilizează prin autoclavare. În momentul folosirii, se toarnă în plăci Petri sau în eprubete, în poziție înclinată.

Prin scăderea procentului de glucoză sau maltoză la 2%, acest mediu poate servi foarte bine pentru cultivarea micetelor levuriforme.

Pentru inhibarea dezvoltării unor bacterii, se poate adăuga mediului de cultură topit și răcit la 50°C, înainte de a fi turnat în plăci, unul din următoarele antibiotice:

— cicloheximidă (actidionă) în proporție de 0,5%
— penicilină G 500 U.I./ml mediu
— streptomicină 100 gamma/ml mediu
— aureociclină 50—100 gamma/ml mediu
— cloromicetină 0,01 g/30 ml mediu
— penicilină 20 U.I./ml + streptomicină 40 gamma/ml

— *Mediul Sabouraud lichid* se prepară din aceleași ingrediente ca și mediul Sabouraud solid, fără a se adăuga agar.

— *Mediul Czapeck* se compune din:

— $NaNO_3$ 2,0 g
— KH_2PO_4 1,0 g
— $MgSO_4$ 0,5 g
— KCl 0,5 g
— $FeSO_4$ 0,01 g
— zaharoză 30,0 g

În loc de zaharoză, pentru izolarea unor ciuperci, se poate folosi glucoza. După preparare, se poate utiliza ca atare, cu 2% agar sau cu 10% gelatină.

— *Mediul cu extract de drojdie de bere* se folosește pentru cultivarea fungilor levuriformi și a dermatofiților. Se obține din:

— extract de drojdie de bere 1 000,0 ml
— glucoză sau maltoză 35,0 g
— geloză 20,0 g

Se ajustează pH-ul la 5,6 și se sterilizează la 121°C timp de 10 minute.

Extractul de drojdie de bere se prepară astfel: se dizolvă 100,0 g drojdie de bere în 1000 ml apă distilată și se fierbe timp de 5 minute. Se filtrează și se răcește, după care se adaugă restul ingredientelor.

— *Mediul cu extract de malț* are aceeași utilizare ca și precedentul. Se compune din:

— extract de malț 1 000,0 ml
— dextroză 20,0 g
— peptonă 1,0 g
— geloză 20,0 g

Pentru obținerea extractului de malț se usucă orz încolțit în etuvă la 30—35°C după care se mojarează. Se amestecă 250 g din mojaratul obținut cu 1000 ml apă distilată, se încălzește timp de 1 oră la 60°C, amestecîndu-se continuu. Se filtrează, se răcește și se adaugă restul ingredientelor, după care se ajustează pH-ul la 5,6. Se sterilizează timp de 10 minute la 121°C.

— *Mediul cu extract de orez* este indicat pentru cultivarea fungilor aflatoxigeni din genul *Aspergillus* și *Penicillium.* Se compune din:

— extract de orez	1 000,0 ml
— geloză	20,0 g

Extractul de orez se prepară astfel: se amestecă 500 g orez decorticat cu 1000 ml apă distilată, se fierbe amestecul timp de 30 minute, după care se filtrează și se lasă să se răcească pînă a doua zi cînd se adaugă geloza. Se sterilizează la 120°C timp de 20 minute.

— *Mediul cu extract de cartofi.* Acest mediu favorizează sporularea și conservarea ciupercilor, fiind preparat din:

— extract de cartofi	1 000,0 ml
— agar	20,0 ml

Pentru prepararea extractului, se curăță și se spală cartofii, după care se dau pe o răzătoare fină. Se amestecă apoi 20 g din cartofii răzuiți cu 1000 ml apă distilată, se lasă la temperatura camerei timp de 1 oră pentru macerare, apoi se fierbe timp de 5 minute. Se filtrează prin vată, se adaugă agarul și se ajustează pH-ul la 5,6. Se sterilizează la 110°C timp de 20 minute.

— *Mediul cu extract de morcovi* se obține în același mod, utilizînd în loc de cartofi, o cantitate egală de morcovi.

— *Mediul Raulin* este indicat pentru cultivarea speciilor pigmentogene din genurile *Aspergillus* și *Penicillium.* Se compune din:

— acid tartric	4,0 g
— carbonat de potasiu	0,6 g
— carbonat de magneziu	0,4 g
— nitrat de amoniu	4,0 g
— fosfat de amoniu	0,6 g
— sulfat de amoniu	0,25 g
— sulfat de fier	0,07 g
— sulfat de zinc	0,07 g
— silicat de potasiu	0,07 g
— zaharoză	70,0 g
— agar	30,0 g
— apă distilată	1500,0 ml

Se dizolvă ingredientele cu excepția zaharozei în 1000 ml apă distilată (zaharoza se dizolvă separat în 500 ml apă distilată). Se sterilizează separat cele două soluții timp de 20 minute la 110°C și se amestecă doar în momentul folosirii. În final pH-ul mediului trebuie să fie de 2,9.

— *Mediul pentru evidențierea pigmentului la ciupercile din genul Trichophyton*

— agar	15,0 g
— mălai	40,0 g
— apă	1 000,0 ml

Se fierbe mălaiul în cca 300—500 ml apă timp de 1 oră, se filtrează și se adaugă filtratul în agarul introdus în apă. Se completează cu apă pînă la 1000 ml, se autoclavează 20 minute la 120°C.

— *Mediul agar-miere pentru cultivarea ciupercilor din genul Microsporum*

— miere	60,0 g
— peptonă	10,0 g
— agar	20,0 g
— extract de drojdie (bacto)	5,0 g
— apă	1 000,0 ml

— *Mediul orez-bilă pentru chlamidospori*

— orez	20,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml
— geloză	20,0 g
— bilă proaspătă	20%

Se fierbe orezul cu 300 ml apă timp de 45 minute, se filtrează prin tifon, se adaugă geloza și se completează cu restul de apă distilată (sterilizarea la 115°C timp de 15 minute), după care se adaugă bila.

— *Mediul Nikerson-Mankowski*

— fosfat monopotasic	1,0 g
— sulfat de amoniu	1,0 g
— biotină	5,0 g
— albastru de tripan	0,10 g
— agar	15,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă toate substanțele, se autoclavează, se adaugă 20,0 g glicogen sau amidon purificat și sterilizat prin tindalizare.

Chlamidosporii fixează electiv albastru de tripan.

— *Agar selectiv DTM Taplin pentru dermatofiți* se folosește pentru izolarea și diferențierea rapidă a dermatofiților din materiale mai mult sau mai puțin contaminate cu bacterii sau alți fungi.

În afară de gentamicină, clortetraciclină și cycloheximidă care inhibă dezvoltarea ciupercilor saprofite, mediul conține și fenol roșu ca indicator pentru fermentarea glucozei, cunoscînd că cele mai multe ciuperci saprofite scindează glucoza cu acidifierea mediului. Prin contrast dermatofiții *(Trichophyton, Microsporum, Epidermophiton)* prin dezaminarea peptidelor determină o alcalinizare a mediului care este slab acid. Prin aceasta se pot diferenția dermatofiții de alți germeni în procent de 97%.

Compoziția mediului :

— peptonă de făină de soia	10,0 g
— D(+) glucoză	10,0 g
— roșu fenol	0,2 g
— cycloheximidă	0,5 g
— gentamicină sulfat	0,1 g
— clortetraciclină	0,1 g
— agar-agar	17,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

pH-ul final = 5,5

Dezvoltarea dermatofiţilor pe acest mediu determină virarea culorii acestuia spre roşu după 72 de ore de incubaţie, coloniile avînd culoarea albă.

În vederea însămînţării, perii, scvamele şi crustele depuse pe o lamă sterilă, se fragmentează în porţiuni cît mai mici cu ajutorul unor instrumente sterile (bisturiu, lamă de ras etc.). Cu vîrful unei anse bacteriologice flambat şi răcit într-un vas cu apă distilată sterilă, se ridică particule din materialul astfel pregătit şi se depun pe suprafaţa mediului de cultură, în diferite puncte.

Produsele semifluide sau lichide se pot însămînţa fie cu ajutorul unui tampon de vată steril, de tipul celui folosit pentru recoltarea exsudatelor faringiene, fie cu ansa de însămînţare sau cu pipeta Pasteur.

Materiile fecale se lasă mai întîi la macerat timp de 24 ore în soluţie de ser fiziologic cu adaos de antibiotice şi după aceea se însămînţează pe mediul de cultură.

Operaţiunile trebuie executate la flacără şi cît mai rapid pentru a evita contaminările cu germeni din exterior.

Din fiecare probă se însămînţează cel puţin 2 tuburi (preferabil mai multe). O serie de tuburi se lasă la temperatura de 20—24°C iar alta se pune la termostat la 37°C.

După însămînţare, culturile se vor examina zilnic, notîndu-se de fiecare dată aspectul macroscopic (suprafaţă, relief, culoare, prezenţa pigmentării, consistenţa, durata dezvoltării, care poate varia de la cîteva zile la 2—3 săptămîni). Aceste date se completează cu examenul microscopic periodic al fragmentelor de colonii. În acest scop, se recoltează din puncte diferite de pe suprafaţa şi din profunzimea coloniilor, mici porţiuni, cu vîrful unei anse de însămînţare sau cu vîrful unui ac de disociere, în prealabil flambate, care se vor depune pe lame degresate, împreună cu cîteva picături de soluţie clarificatoare. Se poate recurge şi la metode de colorare a preparatelor microscopice efectuate din culturi, în scopul unei mai bune vizualizări a elementelor morfologice.

Metode de colorare a preparatelor microscopice efectuate din culturi. În vederea colorării, se suspensionează un mic fragment recoltat dintr-o colonie, într-o picătură de apă distilată sterilă, depusă pe o lamă degresată. Suspensia etalată pe lamă se usucă la temperatura camerei şi se fixează după anumite procedee în funcţie de metoda de colorare care urmează să se aplice.

Colorarea cu albastru de metilen (pentru fungi levuriformi). Se foloseşte o soluţie apoasă de 1% de albastru de metilen cu care se acoperă frotiul, lăsîndu-se în contact 2 minute. Se spală apoi cu apă, se usucă şi se examinează.

Colorarea cu bleu cotton-acetic. Preparatul uscat se fixează prin evaporare cu alcool 95°, se imersează apoi într-o soluţie de bleu cotton-acid acetic timp de 1 minut, se spală cu apă de robinet, se usucă şi se examinează.

Soluţia de bleu cotton-acid acetic se obţine din 0,5 g bleu cotton + 100 ml soluţie 3% de acid acetic.

Metoda Burri. Se omogenizează pe o lamă degresată 1 picătură de apă distilată cu 1 picătură de tuş de China.

Se suspensionează în acest amestec o cantitate de material recoltat cu ansa dintr-o cultură pe mediu solid.

Se usucă și se examinează.

Colorația biacidă Mann. Se fixează frotiul la cald, se răcește și se colorează timp de 1 minut cu un amestec colorant obținut din:

— soluția apoasă 1% eozină	45,0 ml
— soluție apoasă 1% albastru de metilen sau bleu cotton	35,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

— Spălare cu apă de robinet
— Colorare cu soluție alcoolică (70°) de oranj G — 1 minut
— Spălare cu apă
— Uscare
— Clarificare cu toluen și examinare.

Metoda Mann modificată (pentru blastospori și artrospori). Se efectuează suspensia fungică pe o lamă degresată
— Uscare la 37°C
— Fixare prin evaporare cu alcool 95°
— Colorare prin metoda biacidă Mann

Metoda Kufferath modificată de Langeron și Guerro. Uscare și fixare prin căldură (pe o platină șofantă)
— Colorare cu fucsină Ziehl
— Spălare cu apă
— Decolorare timp de cîteva secunde cu alcool clorhidric 1% apoi cu alcool lactic 2%
— Spălare cu apă de robinet
— Colorare cu albastru de Nil 1% — 30 secunde
— Spălare cu apă distilată
— Peste frotiul încă umed se aplică o picătură de tuș de China diluat, care se etalează în strat subțire pe toată lama
— Uscare și examinare

Ascosporii se colorează în roșu iar ascele și blastosporii în albastru-verde pe un fond întunecat.

Colorația Rakette (pentru ascospori). Fixarea frotiului
— Colorare la cald cu o soluție apoasă saturată de verde de malahit, timp de 5 minute
— Spălare temeinică cu apă de robinet
— Colorare cu soluție apoasă 0,25% de safranină
— Spălare, uscare, examinare

Metoda Gray (pentru chlamidospori). Se întrebuințează două soluții:

— Soluția A:

— verde de malahit	0,5 g
— fucsină bazică	0,05 g
— apă distilată	100,0 ml

— Soluția B:
— soluție 8% NaCl

Tehnica de lucru:
— Fixarea frotiului
— Colorare cu un amestec format din 2 părți soluție A + 8 părți soluție B, timp de 10 minute
— Spălare cu apă

— Colorare cu soluţie 5% nigrosin — 2 minute
— Spălare, uscare, examinare
Coloraţia Müller (pentru spori). Fixare
— Colorare cu soluţie 5% de acid cromic — 5 minute
— Spălare cu apă
— Colorare la cald cu fucsină Ziehl
— Se răceşte frotiul şi se decolorează cu soluţie 5% de acid sulfuric
— Spălare cu apă
— Recolorare cu albastru de metilen Löffler
— Spălare, uscare, examinare.
Coloraţia Gram (vezi examenul microscopic al bacteriilor)

Tabelul 9

Caracterele morfo-culturale ale principalelor tipuri de fungi

Genul	Caractere morfo-culturale	
	Macroscopice	Microscopice
Trichophyton	Colonii mici, de cca 1 cm diametru, reliefate, suprafaţa glabră, ceroasă sau pufoasă, de culoare albă sau albă-gălbuie; centrul coloniei cu aspect crateriform, înconjurat de zone concentrice ale coloniei, aderente la mediu	Miceliu abundent; chlamidospori dispuşi în lanţuri; lipsesc artrosporii şi aleuriile
Trichophyton tip favic	Colonii aplatizate, cu suprafaţa prăfoasă, de nuanţă roz-pal	Hife septate, aleurii dispuse în acladium
Microsporum	Colonii de culoare albă care devin cu timpul gălbui-verzui, aspect pufos, centrul consistent, reliefat; au caracter invadant cu aspect lînos	Miceliu ramificat, segmentat, cu extremităţile în formă de rachetă; formaţiuni fusiforme, lungi de 80 microni, late de 20 microni, îngroşate la mijloc şi subţiri la capete, pluriseptate, libere sau prinse de filamente
Aspergillus	Colonii invadante, cu suprafaţa rugoasă, albe-verzui, conidiofori aerieni cu conidiospori caracteristici; culoarea diferă după specie	Miceliu abundent, cu hife septate, incolore, ramificate; conidioforii pornesc dintr-o celulă bazală neseptată, care la partea distală prezintă columela de care sînt fixate sterigmele şi în continuare lanţurile de conidii sferice diferit colorate în funcţie de specie; ascosporii sînt sferici, bruni
Candida	Colonii rotunde, albe, netede, lucioase, opace, margini regulate, nu pigmentează mediul	Lanţuri de pseudomicelii cu celule ovoide la nivelul strangulaţiilor pseudomiceliene şi celule rotunde, ovoide, libere, unele înmugurite
Geotrichum	Colonii mici, cremoase, albe sau gălbui, aderente la mediu, uşor ondulate, uneori cu pseudomicelii rareori ramificate	Artrosporii ovali, cilindrici; pseudomicelii (lanţuri de artrospori) ramificate dicotomic, se fragmentează la nivelul septurilor

Genul	Caractere morfo-culturale	
	Macroscopice	Microscopice
Torulopsis	Colonii albe, gălbui sau brune, cremoase, aderente la mediu, cu margini neregulate, ondulate, concave	Celule ovale sau sferice foarte mici, necapsulate, cu mulţi muguri
Criptococcus	Colonii albe-gălbui-brune, convexe, suprafaţa rugoasă, consistenţă seroasă sau mucoidă	Lipsit de pseudomiceliu, celule de formă ovală sau sferică, 5—20 microni, înmugurite, cu capsulă gelatinoasă groasă, diferite dimensiuni
Nocardia	Colonii galbene neregulate, glabre, maturizare lentă, devin portocalii, cu margini netede, formă stelată pe agar-sînge	Filamente fine, ramificate neregulat, bacili fini
Actinomyces	Colonii mici, albe-cenuşii, netede, se multiplică în condiţii de anaerobioză	Filamente fine, cu diametrul de 1 micron, ramificate sau constituind rozete radiare
Hystoplasma	Colonii albe, pufoase sau brune pe mediu cu zaharuri; colonii netede umede, strălucitoare, albe, pe medii cu azot	Filamente subţiri, lungi, chlamidospori echinulaţi prinşi de un pedicul; blastospori unipolari, înmuguriţi, sferici sau ovoizi, cu o vacuolă mare
Coccidioides	Colonii albe, pufoase, care prin învechire devin galbene pînă la roşu-brun, aderente la mediu	Miceliu septat, ramificat, lărgindu-se sub formă de rachetă; artrospori şi chlamidospori sferici
Penicillium	Colonii circulare, bine delimitate, suprafaţa uscată, pulverulentă, albe-verzui, albastre, roşii sau galbene în funcţie de specie; pigmentează mediul	Miceliu fin, septat, incolor, din care se formează conidioforul aerian, ramificat, la extremitatea lui se fixează lanţurile de conidii, mici, rotunde, colorate
Mucor	Colonii pufoase, cenuşii, floconoase, micelii aeriene, înalte, invadante	Hife neseptate, simple sau ramificate, lipsite de rizoizi; sporangiu mare, sferic, piriform sau cilindric, încărcat cu spori
Absidia	Colonii albe-vătoase, compacte, aderente, fibroase, invadante	Sporangioforii pornesc din hifele internodale, sporangiul are formă emisferică sau rombică, este lipsit de apofiză, dar este încărcat cu spori incolori
Rhizopus	Colonii pufoase, miceliu aerian invadant, alb-cenuşiu, cu puncte dese negre (sporangiofori)	Sporangioforii pornesc din acelaşi loc cu rizoizii formînd noduri; sporangii au formă emisferică, sînt aşezaţi pe apofize şi au culoare neagră
Sporotrichum	Colonii albe, brune, negre, încreţite, umede sau uscate, pulverulente, cu margini pufoase, suprafaţa cu zone concentrice	Miceliu subţire, ramificat; conidiofori scurţi, au la extremitate sau lateral conidii piriforme, izolate sau un buchet de conidii ovale, rotunde sau cilindrice

Genul	Caractere morfo-culturale	
	Macroscopice	Microscopice
Scopulariopsis	Colonii albe-galbene sau brune, cu suprafaţa uscată	Conidiofori ramificaţi neregulat, de care se prind conidiile alungite în formă de alună sau lămîie, dispuse în lanţuri, colorate în galben-brun
Alternaria	Colonii albe, pufoase, miceliul bazal se înnegreşte formînd o membrană densă, pîsloasă. Nu pigmentează mediul	Miceliu septat, incolor; conidiofori simpli sau ramificaţi, groşi, de culoare neagră; conidii negre, alungite piriforme, cu septuri transversale şi longitudinale, luînd aspectul de mură
Trichotecium	Colonii mici, roze, dezvoltate radiar, cu margini filamentoase, suprafaţa glabră, uşor lucioasă	Hife septate, conidiofori simpli, conidii incolore eliptice, cu septum transversal, dispuse sub formă de sferule la capătul conidioforului
Chladosporium	Colonii brune-verzui, invadante, cu suprafaţa uşor ondulată	Hife septate, de culoare brună; conidiile sînt fixate pe conidiofori sub forma unei coroane de copac, sînt uni- sau bicelulare, cilindrice, cu capete rotunjite
Helmintosporium	Colonii albe, pufoase, înalte, invadante, cu miceliu aerian	Hife septate de culoare brună; conidiofori scurţi, conidii solitare sau grupate, pluricelulare, septate transversal, alungite, de culoare neagră

4 – Examenul caracterelor biochimice

Testarea caracterelor biochimice este obligatorie pentru identificarea fungilor levuriformi izolaţi în cultură pură pe medii cu extract de drojdie de bere.

Cele mai utilizate în acest sens sînt:
— testul zimogramei pentru hidraţi de carbon
— auxonograma hidraţilor de carbon (asimilarea zaharurilor)
— auxonograma azotului (asimilarea nitraţilor)
— testul degradării arbutinei
— dezvoltarea în prezenţa alcoolului etilic.

Testul zimogramei pentru hidraţi de carbon se foloseşte în scopul diferenţierii unor specii de ciuperci levuriforme pe baza capacităţii lor diferite de a fermenta unele zaharuri (glucoza, galactoza, maltoza, zaharoza, lactoza).

Mediul de cultură utilizat în acest sens este apa peptonată la care se adaugă un indicator (albastru de brom timol, tinctura de turnesol etc.). şi, bineînţeles, zaharul de cercetat.

Tehnica de lucru. Se dizolvă 10,0 g peptonă în 1000,0 ml apă distilată şi se filtrează prin hîrtie de filtru. Se repartizează în 5 baloane de

200 ml, adăugîndu-se în fiecare cîte unul din zaharuri (4,0 g) și cîte 3 ml indicator (10%) care va colora mediul în roz.

Se repartizează apoi cîte 4 ml din fiecare amestec în eprubete de 12/120 mm peste care se toarnă parafină topită (2 părți parafină + 1 parte oleu de parafină) pentru a forma un strat gros de 3—4 mm. Se sterilizează la autoclav la 115°C timp de 20 minute, se lasă să se răcească pînă la temperatura de 50°C și se însămînțează cu cca 1 ml suspensie în ser fiziologic obținută din culturile fungice. Tuburile însămînțate se incubează la termostat la 28°C, prima citire făcîndu-se după 3—4 zile de la însămînțare, iar ultima (cea definitivă) la 21 de zile. În tuburile în care s-a produs fermentarea, dopurile de parafină se ridică de la suprafața mediului datorită formării bioxidului de carbon.

Auxonograma hidraților de carbon (asimilarea zaharurilor). Testarea capacității de asimilare a zaharurilor constituie un alt mijloc de diferențiere a anumitor specii de ciuperci levuriforme.

Mediul utilizat în acest scop este format din:

— agar	20,0 g
— sulfat de amoniu	5,0 g
— sulfat de magneziu	0,5 g
— fosfat monopotasic	1,0 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se dizolvă la cald agarul în 500 ml apă distilată și separat celelalte ingrediente în restul de apă distilată, după care cele două amestecuri se pun într-un singur balon și se sterilizează, timp de 20 minute, la autoclav la 115°C. Se lasă să se răcească pînă la 45°C, după care se adaugă mediului 0,2 ml cultură din mediul lichid cu extract de drojdie de bere. Se repartizează în plăci Petri care se lasă la temperatura camerei pînă a doua zi cînd, pe suprafața fiecăreia, se așază în 5 puncte marginale, marcate, rondele de hîrtie de filtru îmbibate în cîte unul din zaharurile de cercetat: glucoză, lactoză, galactoză, maltoză și zaharoză. Plăcile se pun apoi la incubat timp de 1—2 zile la temperatura de 25°C. Dezvoltarea culturii de levuri însămînțate în jurul uneia sau mai multor rondele semnifică asimilarea zaharului respectiv, necesar multiplicării germenului respectiv.

Auxonograma azotului. Pentru testarea capacității de asimilare a compușilor azotați se folosește un mediu compus din:

— geloză	20,0 g
— sulfat de magneziu	0,25 g
— fosfat monopotasic	1,5 g
— biotină	10^{-8}
— thiamină	10^{-6}
— pyridoxină	10^{-6}
— acid nicotinic	10^{-6}
— panthotenat de calciu	10^{-6}
— inozitol	10^{-5}
— oligoelemente (soluție Berthelot)	10 picături
— apă distilată	1 000,0 ml

Se procedează de aceeași manieră ca și în cazul auxonogramei hidraților de carbon, înlocuindu-se zaharurile cu diferite surse de azot: peptonă, asparagină, histidină, uree, nitrat de potasiu, sulfat de amoniu etc.

Testul degradării arbutinei. Capacitatea unor levuri de a degrada arbutina în glucoză şi hidrochinonă facilitează identificarea acestora. Pentru cultivare se foloseşte următorul mediu:

— extract de drojdie de bere	1 000,0 ml
— agar	20,0 g
— arbutină	5,0 g

Se sterilizează la 115°C timp de 20 minute.

Mediul se repartizează în plăci Petri în care, în prealabil, s-a pus cîte o picătură de clorură ferică — soluţie concentrată, care va imprima mediului o culoare galbenă-închisă. După o incubare de 2—6 zile se constată în jurul coloniilor care au degradat arbutina, formarea unui inel de culoare brună-închisă.

Utilizarea alcoolului etilic este un test prin care se diferenţiază speciile de levuri care se dezvoltă în prezenţa alcoolului etilic de cele care sînt inhibate de acesta.

Se prepară un mediu din:

— fosfat monopotasic	1,0 g
— sulfat de magneziu crist.	0,5 g
— sulfat de amoniu	0,1 g
— apă distilată	1 000,0 ml

Se sterilizează timp de 15 minute la 115°C, se răceşte şi se adaugă alcool etilic 96° în proporţie de 3% şi cîteva picături de extract de drojdie de bere. După însămînţare, tuburile în care s-a repartizat mediul, se lasă la incubat timp de 1—3 săptămîni. Se pregăteşte totodată şi un set de tuburi martor, conţinînd mediu de cultură fără alcool. Tuburile în care s-au dezvoltat fungii în prezenţa alcoolului se notează cu plus iar celelalte cu minus.

5 – Examenul histopatologic

Este un mijloc indispensabil de diagnostic pentru micozele viscerale.

Recoltarea şi prelucrarea probelor de ţesuturi şi organe se fac prin metodele obişnuite de histologie. În ceea ce privesc tehnicile de colorare, trebuie specificat că evidenţierea miceţilor în ţesuturi necesită metode speciale de colorare, tehnicile obişnuite, respectiv coloraţia cu hematoxilină-eozină, tricromică etc., avînd o eficienţă mai redusă decît în alte cazuri.

Cu rezultate bune se folosesc mai multe metode.

Coloraţia PAS (după Mc Manus-Mowry, Müller)

Reactivi necesari:

— soluţie de acid periodic 1%

— reactiv Schiff

— acid clorhidric 1 n (HCl concentrat cu greutatea specifică 1,19—83,5 ml + apă distilată ad 1000 ml)

— un amestec format din:

— metabisulfit de potasiu 10%	5,0 ml
— acid clorhidric 1 n	5,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

Tehnica de colorare: — deparafinarea secţiunilor în xilol
— alcool de concentraţii descrescînde
— apă distilată
— acid periodic 1% timp de 10 minute
— spălare în apă de robinet timp de 15 minute
— reactiv Schiff — 10 minute
— spălare în 3 băi succesive de apă sulfuroasă (vezi amestecul de mai sus), cîte 5 minute în fiecare baie
— spălare rapidă cu apă de robinet
— colorare de contrast cu soluţie slabă de hemalaun Mayer (30 secunde)
— spălare în apă de robinet — cca 3 minute
— băi de alcool în concentraţii crescînde
— xilol
— montare în balsam de Canada

Formaţiunile micotice apar colorate în roşu pe un fond albastru-deschis.

Impregnaţia argentică după Gömöri modificată de Grocott constă în următoarele:
— Deparafinare în xilol
— Hidratare prin băi de alcool de concentraţii descrescînde
— Spălare cu apă distilată
— Oxidare cu ajutorul unei soluţii de acid cromic 5% timp de 1 oră
— Spălare cu apă
— Tratare cu soluţie de bisulfit de sodiu 1% timp de 1 minut (pentru îndepărtarea excesului de acid cromic)
— Spălare cu apă de robinet 5—10 minute
— Spălare cu apă distilată (3—4 băi)
— Tratare cu un amestec preparat ex tempore din următoarele soluţii: 5 ml NO_3Ag 5% + 100 ml metenamină 3% (precipitatul alb care se formează dispare prin agitare); din această soluţie se iau 25 ml care se diluează cu 25 ml apă distilată şi în momentul folosirii se adaugă 2 ml dintr-o soluţie de borat de sodiu 5%; lamele se imersează în băile cu această soluţie timp de 30—60 minute la 58—60°C pînă la apariţia culorii galbenă-brună; prin examinare la microscop se verifică intensitatea coloraţiei, elementele micotice devenind brune-închis (manipularea lamelor se va face cu ajutorul unor pense de material plastic sau a unor pense parafinate).
— Spălare succesivă în 6 băi de apă bidistilată
— Tratare cu soluţie de clorură de aur 0,1% timp de 2—5 minute
— Spălare cu apă bidistilată
— Fixarea argintului într-o soluţie de thiosulfat de sodiu 2% timp de 2—5 minute
— Spălare cu apă de robinet
— Spălare cu apă acetică 1/500
— Colorare de fond cu hemalaun (hematoxilină-eozină-safran) sau cu verde de lumină (0,2% în apă acetică)
— Tratare cu carbonat de litiu
— Spălare cu apă

— Deshidratare prin băi de alcool de concentrații crescînde pînă la alcool absolut

— Clarificare în xilol

— Montare în balsam

Rezultate: dacă colorarea s-a făcut corect, pereții ciupercilor apar colorați intens pînă la negru, mucina în gri-pal, iar interiorul miceliului în roz-decolorat, pe un fond albastru sau verde, în funcție de colorația de contrast utilizată.

Metode de colorare vitală. Sînt mult mai rar folosite.

Constau în inocularea la animalul viu a unor substanțe colorante netoxice, care au proprietatea de a se fixa în anumite celule sau țesuturi.

După un anumit interval de timp se efectuează biopsii, urmate de examinarea secțiunilor histologice.

Metode de colorare postvitală. Se fac în prealabil biopsii, după care materialul obținut se prelucrează imediat histologic, colorîndu-se cu un colorant vital.

Cu ajutorul acestei metode se urmărește punerea în evidență a unor modificări morfologice și structurale ale organitelor celulare, condiționate de prezența unor fungi sau a produselor elaborate de aceștia.

Metode şi tehnici de laborator pentru diagnosticul micotoxicozelor

Micotoxicozele animalelor sînt boli produse de acţiunea toxinelor elaborate de către fungii patogeni sau condiţionat patogeni care se dezvoltă în furaje. Ca urmare, precizarea diagnosticului de micotoxicoză se va face prin examinarea furajelor care au constituit hrana animalelor îmbolnăvite.

Recoltarea, ambalarea şi transportul probelor de furaje

De modul în care se face recoltarea, ambalarea şi transportul probelor de furaje în vederea examenelor de laborator, depinde în foarte mare măsură stabilirea corectă a diagnosticului.

Probele de furaj trebuie să fie cît mai reprezentative, în sensul de a oferi modificări organoleptice care să justifice suspiciunea de furaj toxic.

În acest sens, recoltarea se va face după cum urmează:

— pentru fibroase, se recoltează din mai multe puncte ale stocului, o cantitate totală de cca 5 kg pentru fiecare 25 tone de furaj, care se amestecă, făcîndu-se o probă medie, din care se expediază laboratorului o cantitate de 1 kg. Din porţiunile furajului-stoc, care prezintă modificări organoleptice pregnante, se recoltează separat alte probe care vor fi transportate la laborator cu menţiunea respectivă. Probele se ambalează în saci care se închid şi se marchează printr-un indicativ pe baza căruia să poată fi identificate;

— pentru furajele combinate şi grăunţe se face, de asemenea, o probă medie de amestec de cca 10 kg din care se trimite la laborator 1 kg. Acestea se ambalează în pungi de material plastic sau borcane de sticlă cu capac etanş, notîndu-se pe fiecare provenienţa;

— din silozuri, se recoltează cu sonda din mai multe puncte, în diagonală, la distanţă de 2—3 m şi la o adîncime de 50—100 cm;

— pentru furajele verzi, se examinează mai întîi păşunea, după care se vor recolta plantele cu modificări suspecte de a fi de natură micotică. Este bine ca în prealabil aceste plante să fie uscate şi după aceea expediate la laborator, pentru a le asigura o cît mai bună conservabilitate în timpul transportului. Ele se ambalează dacă este posibil individual, în hîrtie albă, curată.

Toate probele de furaje vor fi însoțite de note explicative referitoare la proveniență, data și modul de recoltare, condițiile în care a apărut intoxicația și la ce efectiv, date anamnetice privind manifestările clinice ale bolii.

Investigațiile de laborator trebuie să cuprindă examenele descrise în continuare.

1 – Examenul organoleptic

Se examinează în acest sens aspectul, culoarea, mirosul, consistența furajului, urmărindu-se totodată și prezența sau absența formațiunilor micotice, notîndu-se amănunțit rezultatele examenului.

2 – Examenul microscopic direct

Urmărește să stabilească prezența ciupercilor în furaj, precum și gradul de contaminare a furajului.

În acest scop, probele de furaje se examinează mai întîi sub lupă, pentru a se stabili existența florei micotice și totodată pentru a se putea alege porțiunile de furaj contaminate.

Se raclează apoi cu ajutorul unui bisturiu steril formațiunile micotice de pe suprafața și din interiorul furajului, raclatul obținut punîndu-se pe lame, împreună cu cîteva picături de apă distilată sau hidrat de sodiu sau potasiu 20%; se acoperă cu o lamelă fină și se examinează la microscop.

O altă parte din aceeași probă se pune într-un vas de sticlă cu apă distilată, se agită temeinic pentru a spăla cît mai bine furajul, se lasă să sedimenteze sau se centrifughează și, după îndepărtarea supernatantului, se examinează la microscop sedimentul între lamă și lamelă. În acest fel, se poate aprecia global și gradul de contaminare a probei. Pentru precizie se poate recurge la numărătoarea sporilor în camera Thoma.

Această primă apreciere a gradului de contaminare, care este totuși subiectivă, trebuie urmată de un examen cultural cantitativ. Acesta este indispensabil mai ales pentru furajele combinate, făinuri etc. la care din cauza măcinării, structurile formațiunilor micotice se denaturează și, ca urmare, examenul microscopic direct nu oferă posibilitatea unei aprecieri corespunzătoare.

3 – Examenul cultural cantitativ

Se ia o cantitate de 5 g din proba medie de furaj, se macină bine și se amestecă cu 74 ml soluție fiziologică și 1 ml laurisulfonat de sodiu 1%.

Suspensia obținută se pune într-un triturator, timp de 30 secunde la o turație de 12 000 t/minut.

Se adaugă apoi 20 ml soluţie de carboximetilceluloză 35% şi se omogenizează din nou în triturator, timp de 1 minut la aceeaşi turaţie, obţinîndu-se în acest fel o suspensie 1 : 20.

Din această suspensie se fac diluţii zecimale succesive într-un amestec de soluţie fiziologică şi carboximetilceluloză 2%, pînă la diluţia 1/200 000.

Se însămînţează cîte 1 ml din fiecare diluţie, în 4 plăci Petri cu diametrul de 10,5 cm, în care s-au pus în prealabil cîte 15 ml mediu de cultură topit şi răcit pînă la 45°C, avînd grijă ca fiecare tub să fie bine agitat înainte de însămînţare, pentru omogenizarea suspensiei. Mediul însămînţat se amestecă cu suspensia de furaj adăugată, prin înclinări repetate ale plăcilor, şi se lasă să se solidifice la temperatura camerei. Plăcile sînt apoi aşezate cu capacul în jos într-un termostat la 25°C.

Prima citire se face la 12 ore şi ea se va continua zilnic timp de o săptămînă, notîndu-se de fiecare dată numărul de colonii care s-au dezvoltat în plăci şi calculîndu-se, în final, după numărul mediu de colonii, numărul de spori de miceţi care revin la 1 g de furaj. Cantităţile maxime de spori de miceţi pe un gram de furaj sînt: pentru cereale — 500 000, nutreţuri combinate — 300 000, făinuri şi concentrate proteice — 10 000. Se consideră în general că o medie de 10 000—320 000 colonii/gram de furaj, denotă un grad de contaminare suficient de mare pentru a fi în măsură să incrimineze furajul respectiv drept cauză a manifestărilor toxice la animalele care l-au consumat.

4 – Examenul cultural calitativ

Se face cu scopul izolării în culturi pure a miceţilor din furaje, pe baza cărora să se poată face identificarea acestora.

Cele mai bune condiţii de cultivare a fungilor din furaje şi care permit totodată elaborarea micotoxinelor, le oferă mediile naturale (cartof, morcov, sfeclă) şi mediile artificiale, care, pe lîngă geloză, conţin şi un produs natural (făină de cereale, extract de cartofi, morcovi etc.).

Pregătirea mediilor naturale este extrem de simplă: se taie porţiuni adecvate ca formă eprubetelor în care se introduc, se sterilizează la autoclav 30 minute şi se însămînţează.

Cu rezultate bune se poate folosi şi mediul Czapeck.

Se poate adăuga mediului de cultură 20 U.I./ml penicilină şi 40 micrograme/ml streptomicină, cu scopul de a evita dezvoltarea florei bacteriene de asociaţie.

Pregătirea materialului în vederea însămînţării lui pe medii de cultură constă în:

— fragmentarea foarte măruntă a furajelor consistente, grosiere, contaminate;

— seminţele se pot depune ca atare pe suprafaţa mediului de cultură solid, sau se pot fragmenta; pentru izolarea fungilor din profunzimea seminţelor se raclează conţinutul acestora pe mediul de cultură;

— furajele combinate se împrăştie în strat subţire, în cantitate redusă, pe o coală albă de hîrtie, ridicîndu-se apoi cu o ansă umectată din porţiunile care prezintă modificări organoleptice.

Însămînţarea materialului se face după regulile cunoscute, respectîndu-se condiţiile de sterilitate. Materialul se depune cu ajutorul ansei în puncte diferite, distanţate, pe suprafaţa mediului, astfel încît coloniile ce vor rezulta să fie izolate şi să nu necesite, în consecinţă, pasajul lor ulterior. Din fiecare probă se însămînţează cel puţin 2 tuburi sau plăci. O serie de tuburi se incubează la temperatura camerei, iar cealaltă (corespondentă) la termostat la 28°C.

Examinarea macroscopică a culturilor trebuie făcută zilnic, notîndu-se amănunţit toate caracterele culturii. Ea trebuie însoţită periodic şi de examenul microscopic al unor mici porţiuni detaşate din colonii, pentru înregistrarea detaliilor de structură microscopică a fungilor respectivi, pe baza cărora se va face încadrarea sistematică a acestora (familie, gen, specie), uzînd de determinatoarele micologice.

În cazul în care pe un mediu s-au dezvoltat mai multe tipuri de colonii este necesar ca acestea să se izoleze pe medii separate pentru obţinerea coloniilor pure.

Examenul morfo-cultural al fungilor se mai poate practica şi cu ajutorul microculturilor efectuate pe lame. Acesta are avantajul de a permite efectuarea unui examen micologic complet fără deteriorarea coloniilor de miceţi. În acest sens se pot folosi metodele descrise în continuare.

Metoda Van Fieghen foloseşte inele de sticlă cu diametrul de 2 cm şi înălţimea de 1 cm, care se imersează cu ajutorul unei pense sterile în parafină topită. Se aşază apoi imediat inelul la mijlocul unei lame de microscop sterile şi în mijlocul lui se pune puţină apă sterilă.

Se iau lamele fine, se flambează şi în mijlocul lor se pune cu ajutorul unei pipete Pasteur o picătură de mediu de cultură lichid în care se va însămînţa o cantitate foarte mică din materialul de cercetat. Se unge marginea superioară a inelului de sticlă cu lanolină, se flambează trecînd cu o flacără peste el şi se aplică apoi lamela cu picătura însămînţată în jos. După cîteva zile de incubaţie, se examinează la microscop.

Metoda culturii pe lamelă gelozată este asemănătoare cu precedenta, fiind însă superioară acesteia, prin faptul că permite examinarea culturii în dezvoltare cu un obiectiv puternic al microscopului.

Se lipeşte cu lanolină un inel de sticlă pe o lamă de microscop. Se gelozează apoi una din feţele unei lamele sterilizate ţinută orizontal (pentru manevrare lamela se înfige cu un colţ într-un bloc de plastilină), turnînd geloza topită cu ajutorul unei pipete Pasteur. După răcire, se însămînţează o cantitate mică de cultură în mijlocul lamelei cu ajutorul unei anse. Se unge cu lanolină sterilă marginea superioară a inelului de sticlă, iar în spaţiul delimitat de acest inel pe lamă, se pune puţină apă distilată. Se aşază apoi lamela cu faţa gelozată (însămînţată) în jos, pe marginea superioară a inelului. Se pune la incubat şi se examinează zilnic, urmărindu-se astfel dezvoltarea culturii pe tot parcursul său.

5 – Testarea micotoxicităţii probelor de furaje

Simpla identificare a ciupercilor în furaj, chiar în condiţiile unui grad mare de contaminare (a cărui apreciere rămîne totuşi subiectivă din cauza dificultăţilor de obţinere a unor suspensii perfect omogene),

nu oferă suficiente argumente pentru a se considera că ele au fost cauza îmbolnăvirii animalelor și, ca urmare, nu poate îndreptăți scoaterea furajelor respective din alimentația animalelor. Certitudinea asupra acestui fapt se poate obține numai prin testarea toxicității lor pe animale de laborator, alegîndu-se în acest scop specii cunoscute ca fiind cele mai receptive față de una sau alta din speciile de fungi a căror toxicitate trebuie testată. Micotoxicitatea furajelor poate fi determinată prin diferite procedee. Unul dintre acestea constă în administrarea în hrana unor animale de laborator a unei cantități din furajul provenit din stocul în care au fost identificați fungi.

Reproducerea bolii la animalele de experiență confirmă faptul că tulburările semnalate la animalele îmbolnăvite în urma consumului de asemenea furaje se datoresc intoxicației micotice.

Un alt procedeu de testare constă în inocularea la șoareci a micotoxinelor extrase din furajele contaminate cu miceți.

Metoda este bineînțeles mai laborioasă, prin tehnica de extracție a toxinelor din ciuperci, dar rezultatele par să fie mai sigure și se obțin mai rapid.

Extracția micotoxinelor din furaje se face cu ajutorul aparatului Soxhlet, la cald.

Tehnica de lucru. Se macină foarte bine 200 g din proba de furaj de examinat care se fracționează apoi în 2 părți egale, respectiv a cîte 100 g fiecare.

Într-un cartuș confecționat din hîrtie de filtru (pe măsura extractorului) se ambalează una din aceste probe, se introduce cartușul în extractor, după care se pun în balon cca 400 ml eter etilic. După reglarea băii de apă la 40°C, se acționează sistemul de răcire prin deschiderea robinetului, astfel ca apa să ajungă prin furtun la refrigerent. Extracția durează 5—7 ore.

Se procedează asemănător și cu cea de a doua probă de 100 g, extracția făcîndu-se cu cloroform, la o temperatură mai mare, respectiv 65°C.

După terminarea extracției, cînd temperatura apei din baia marină este egală cu cea a camerei, se trece conținutul balonului într-un creuzet de porțelan, așezat pe o baie de nisip încălzită electric pînă la temperatura de 60°C. Se lasă să se evapore soluția extractantă, pînă cînd în creuzet rămîne o substanță cu consistență cleioasă. După ce a dispărut complet mirosul substanței de extracție (eter, cloroform), în fiecare creuzet se pun cîte 20 ml ulei rafinat de floarea-soarelui (care în prealabil a fost filtrat și sterilizat) sub amestecare continuă cu pistilul unui mojar.

Se obține în acest fel o suspensie uleioasă din care se vor face inoculări la șoareci. În acest scop, se fac 3 loturi de șoareci în vîrstă de 30 de zile și cu o greutate individuală de 18 g, fiecare lot fiind compus din minimum 3 animale.

Șoarecilor din primul lot li se vor inocula 0,5 ml/cap, celor din lotul al doilea cîte 1 ml/cap, în timp ce la șoarecii martor se inoculează pe aceeași cale, 1 ml din uleiul folosit ca vehiculant.

Începînd cu următoarea zi de după inoculare, se urmărește starea clinică a șoarecilor, înregistrîndu-se mortalitatea și timpul scurs de la inoculare și pînă în momentul morții animalelor.



Interpretarea rezultatelor:

— se apreciază ca netoxice furajele din al căror extract a fost inoculată doza de 1 ml și nu a omorît șoarecii în decurs de 3 zile de la inoculare;

— se consideră toxice furajele al căror extract omoară șoarecii inoculați cu cantitatea de 1 ml, dar nu și pe cei inoculați cu 0,5 ml, în timp de 1—2 zile;

— furajele sînt foarte toxice, dacă extractul lor omoară șoarecii inoculați cu 0,5 ml și 1 ml în decurs de 1—2 zile de la inoculare.

Testul dermonecrotic. Gradul de toxicitate a extractelor de nutrețuri contaminate cu miceți se poate determina și prin metoda cutanată la iepuri sau șoareci albi.

După depilarea unei zone din regiunea dorsală, se aplică extractul pe pielea ușor scarificată, urmărindu-se modificările locale care apar, pe baza cărora furajele vor fi încadrate ca:

— foarte puțin toxice (gradul I de toxicitate) cînd animalele prezintă un ușor eritem și sensibilitate crescută;

— puțin toxice (gradul II de toxicitate) dacă reacțiile locale se reduc la eritem, sensibilitate crescută, vezicule și ușoară îngroșare a pielii;

— toxice (gradul III de toxicitate) la formarea eritemului, veziculelor, a unor ulcere și cruste, însoțite de sensibilitate crescută;

— foarte toxice (gradul IV de toxicitate) cînd animalele prezintă local sensibilitate crescută, eritem, vezicule, necroze și ulcere profunde ce cuprind și țesuturile subdermice.

Testarea micotoxicității pe mormoloci de broască. Se folosesc mormoloci de broască în vîrstă de 2 săptămîni. În acest scop, se recoltează ouă de broască care se repartizează în vase mari de sticlă, în apă de robinet amestecată cu apă de baltă. După eclozionare, mormolocii se trec în vase cu apă de robinet (care trebuie schimbată zilnic), notîndu-se data eclozionării. Ca hrană, se administrează mormolocilor pînă la vîrsta de 2 săptămîni, salată verde proaspătă, fiartă și răcită. În timpul experimentului, hrana se suprimă.

Extractele probelor se pun în pahare Berzelius și se evaporă pînă la uscare. Se adaugă apoi 1—2 ml de alcool etilic și 10 ml apă de robinet, se așază amestecul în baia marină pentru evaporarea alcoolului, după care se completează cu apă pînă la un volum care să asigure 10 ml soluție/cap de mormoloc.

Separat, se amestecă 1—2 ml alcool și 10 ml apă, se evaporă alcoolul, se completează cu apă și se introduc mormolocii martori.

Se urmăresc rezultatele la 24, 48 și 72 ore, notîndu-se mormolocii morți la aceste intervale.

Din a 3-a zi de experiență, mormolocii pot primi hrană.

După 3—5 zile de la începutul experimentului, mormolocii care supraviețuiesc se scot din soluția cu toxină și se trec în vase cu apă de robinet, urmărindu-se în continuare modificările care apar în metamorfoza lor față de a celor martori.

Folosirea ouălor embrionate de găină se bazează pe acțiunea toxică a extractelor inoculate în camera de aer. Prin această metodă se poate calcula și DL_{50} în micrograme/ou și coeficientul de toxicitate a diferitelor micotoxine cercetate. Dintre acestea, aflatoxina B_1 pare a fi cea mai toxică pentru ouăle embrionate.

Folosirea protozoarelor. Dintre protozoare, *Paramaecium caudatum* este cel mai frecvent folosit în acest scop. Testarea se face prin amestecarea extractelor suspecte de a conţine micotoxine, cu culturi de protozoare în eprubete, pe lame escavate sau lame obişnuite, urmărindu-se apoi la microscop efectul asupra mobilităţii şi aspectului protozoarelor.

Folosirea culturilor celulare presupune utilizarea unor culturi de celule sensibile (celule renale de viţel în vîrstă de 14—16 săptămîni, în cultură primară). Inocularea se face la 7—8 zile de incubaţie la 37°C staţionar, după care se urmăreşte apariţia efectului citotoxic, apreciindu-se procentul de celule distruse şi modificările morfologice care se instalează.

Asupra acestor din urmă metode nu au fost date detalii de tehnică, ele fiind mai pretenţioase şi ca urmare mai greu de aplicat în orice laborator.

Un examen micologic al furajelor trebuie să includă mai multe mijloace de diagnostic din cele menţionate şi numai prin corelarea rezultatelor obţinute la fiecare testare să se tragă concluzia finală referitoare la toxicitatea sau netoxicitatea furajului examinat, luîndu-se în consecinţă măsurile cele mai corespunzătoare de combatere şi prevenţie.

Determinarea sensibilităţii fungilor faţă de acţiunea micostaticelor (antimicograma)

Tehnica de lucru este asemănătoare celei utilizate pentru antibiogramă, folosind însă pentru însămînţări mediul PC (macerat de cartofi şi morcovi). Se însămînţează suspensia de cercetat, se lasă să se usuce suprafaţa mediului, după care se depun pe suprafaţa acestuia micocomprimate sau rondele de hîrtie de filtru îmbibate cu diverse micostatice: Nistatin, Amphotericină B, Griseofulvină, Micostatin, Sulphamethoxypiridozină, Sulphydiazină, Piramicin, Candicidină etc.

Pentru solubilizarea substanţelor micostatice, în vederea îmbibării rondelelor de hîrtie de filtru, se foloseşte metanol într-o anumită concentraţie penru fiecare substanţă în parte.

Interpretarea se face ca şi în cazul antibiogramei la bacterii.

Termeni micologici folosiţi frecvent (după G. R. Carter, 1973)

Artrospor = spor asexuat, format prin fragmentarea miceliului. Exemplu: *Geotrichum candidum.*

Ascospor = spor sexuat caracteristic pentru levurile adevărate şi ascomicete. Sînt produşi într-o formaţiune asemănătoare unui sac numit ască. Ascosporul rezultă din fuziunea a doi nuclei. Exemplu: *Saccharomyces spp., Nannizzia spp.*

Asca = structură caracteristică specializată, în formă de sac la levurile adevărate la care se constituie ascospori. Exemplu: *Saccharomyces spp.*

Blastospor = spor format ca rezultat al procesului de înmugurire pe traiectul miceliului sau dintr-un singur spor. Exemplu: *Saccharomyces spp., Candida spp.*

Chlamydospori = spori rezistenţi, cu peretele gros, formaţi direct prin diferenţierea hifelor. Exemplu: *Candida albicans, Histoplasma capsulatum.*

Columella = partea superioară a sporangioforului, în formă de cupolă. Exemplu: *Mucor spp.*

Conidie = spor asexuat format prin strangularea hifei, înmugurire sau diviziune septală. Exemplu: *Penicillium spp.*

Conidiofor = o ramură a miceliului, în formă de peţiol, pe care se dezvoltă conidiile izolate sau în număr mai mare. Exemplu: *Penicillium spp.*

Dermatiaceous = acest termen se foloseşte pentru a desemna ciupercile brune-închis sau negre. Exemplu: *Philiaphora spp.*, *Hormodendrum spp.*

Dimorf = au două forme sau faze, exemplu forma levuriformă şi forma miceliană. Exemplu: *Blastomyces dermatitidis.*

Endogen = îşi au originea sau sînt produse din interior. Exemplu: infecţiile cu *Candida albicans* obişnuit sînt considerate endogene.

Exogen = îşi au originea din afară. Exemplu: infecţiile cu *Histoplasma capsulatum.*

Ectothrix = artrosporii apar la exteriorul firului de păr. Exemplu: *Microsporum spp.*

Endothrix = artrosporii apar în interiorul firului de păr. Exemplu: *Trichophyton spp.*

Geofil = desemnează fungi al căror habitat natural este solul. Exemplu: *Coccidioides immitis.*

Germeni tubulari = structură asemănătoare unui tub, produsă prin germinarea sporilor. Se dezvoltă formînd hife. Exemplu: *Candida albicans.*

Glabru = forma netedă. Exemplu: forma glabră de la *Geotrichum candidum.*

Hifă = filamentele care constituie corpul thalului unei ciuperci.

Hife în formă de rachetă = hife cu segmentul terminal tumefiat, constituind o formaţiune asemănătoare cu o rachetă de tenis. Exemplu: *Dermatophytes.*

Levuri = fungi unicelulari care se reproduc prin înmugurire asexuată sau prin ascospori produşi sexuat. Exemplu: *Saccharomyces spp.*

Macroconidii = spor mare, uneori multicelular. Exemplu: *Dermatophites.*

Microconidii = conidii mici, unicelulare, formate lateral pe hife. Exemplu: unele specii de *Microsporum* şi *Trichophyton.*

Miceliu = strat format din împletirea hifelor.

Nod = punctul din stolon din care pornesc rhizoizii. Exemplu: *Rhizopus spp.*

Pseudohife = filamente constituite din prelungirea celulelor înmugurite, care nu s-au detaşat. Exemplu: *Candida albicans.*

Rhizoid = hife ramificate, asemănătoare rădăcinilor, care se extind în mediu. Exemplu: *Absidia spp.*

Septat = hifele au pereţi transversali sau septumuri.

Sporangiu = o structură închisă, adesea sferică, în care se formează spori asexuaţi, prin clivare. Exemplu: *Rhizopus spp.*

Sterigma = structuri specializate, scurte sau alungite, prinse de o veziculă şi care produc conidii. Exemplu: *Aspergillus spp.*

Stolon = o hifă orizontală care formează lăstari în locurile unde atinge substratul, dînd naştere la rizoizi. Exemplu: *Absidia spp.*

Zygospor = spor sexuat, cu perete gros, la fungii adevăraţi, care rezultă din fuziunea a 2 gametangii similare. Exemplu: *Phycomycetes.*

Conservarea microorganismelor şi a unor materiale biologice

Conservarea culturilor microbiene sau a suşelor virale izolate din diferite procese patologice sau din mediul ambiant este necesară atît pentru păstrarea colecţiilor, cît şi pentru lucrările curente de investigare a însuşirilor lor biologice. În studiile de tipizare, clasificare şi comparare a acestor însuşiri, este nevoie de conservarea îndelungată a proprietăţilor tulpinilor respective, ceea ce este posibil numai în anumite condiţii. Este necesar să se ţină cont în aceste lucrări de cîţiva factori esenţiali:

— o temperatură optimă de conservare pentru fiecare specie;

— o umiditate convenabilă pentru a evita deshidratarea mediilor de cultură;

— o luminozitate redusă;

— un mediu de cultură convenabil, care să asigure o longevitate maximă.

Temperatura optimă pentru conservarea microorganismelor este variabilă cu specia. Există unele specii care se conservă de preferinţă la temperatura camerei (*Pasteurella, Corynebacterium,* micobacteriile etc.), în timp ce altele (listeriile, bacilul rujetic, stafilococii) se păstrează mai bine la temperaturi scăzute. În acest din urmă caz, se poate recurge la temperaturile realizate de frigiderele obişnuite (+4°C) sau la congelări sub 0°C (—20°C —90°C) folosindu-se congelatoare speciale. Durata conservării este în principiu cu atît mai mare cu cît temperatura este mai joasă. Aşa, de exemplu, dacă în cazul germenilor care se ţin la temperatura camerei este necesară pasarea periodică a tulpinilor la intervale variabile cu viabilitatea lor, în cazul congelării lor se pot conserva în cele mai multe cazuri luni, sau chiar ani. O condiţie importantă în cazul conservării prin congelare este să nu se producă decongelări şi recongelări.

Umiditatea convenabilă este realizată, în cazul bacteriilor, prin folosirea unor medii corespunzătoare şi împiedicarea deshidratării lor. Pentru a evita uscarea mediilor este necesară închiderea cît mai etanşă a recipientelor în care se găsesc culturile respective. Metodele mai frecvent folosite pentru închiderea tuburilor sînt următoarele:

— închiderea la flacără, care realizează o etanşeizare perfectă şi sigură, dar presupune o dotare corespunzătoare, iar la deschidere se întîmpină anumite dificultăţi;

— închiderea prin parafinare: în acest scop dopul de vată se înfundă pînă la nivelul gurii tubului și se impregnează apoi cu parafină topită, aspirată într-o pipetă. Etanșeizarea nu este adesea perfectă așa încît nu asigură întotdeauna evitarea deshidratării. La deschidere se recurge la încălzirea tubului și scoaterea dopului cu o pensă sau cel mai bine, cu un cîrlig special în formă de tirbușon cu o singură ansă, care se înșurubează ușor în dopul parafinat;

— închiderea cu dopuri de cauciuc, obișnuite sau speciale, se face după ce în prealabil dopul de vată a fost împins în interiorul tubului. Este bine ca dopurile de cauciuc să fie sterilizate în prealabil prin fierbere sau, preferabil, prin autoclavare în plăci Petri de dimensiuni mai mari, unde ele se aranjează pe unul sau mai multe rînduri în funcție de înălțime (este mai recomandabil un singur rînd, pentru a evita lipirea dopurilor între ele). Fixarea lor la eprubete se face în boxa sterilă, la flacără, luîndu-se toate măsurile de precauție și în special temeinica flambare a părții superioare a dopului de vată și a gurii tubului (după flambare este necesar ca tubul să se răcească pentru a preîntîmpina topirea cauciucului și aderența la pereți). Există dopuri speciale care, pe lîngă partea destinată a intra în interiorul tubului, au și o buză externă care îmbracă marginea acestuia, realizînd o etanșeizare mai bună;

— închiderea cu dopuri de plută sterilizate: stratul superficial al dopului de vată, care depășește gura tubului se arde la flacără, se împinge cu o pensă spre interiorul tubului și se pune dopul de plută. Etanșeizarea nefiind absolută, se înțelege că în timp se produce deshidratarea lentă a conținutului;

— închiderea cu bandă de leucoplast este ca și precedenta imperfectă și poate fi folosită doar cu titlu de provizorat. În plus, ea nu ferește culturile de infestare cu ciuperci;

— astuparea cu o rondelă de sticlă după înfundarea dopului de vată: fixarea se face cu un strat gros de gelatină glicerinată. După uscare se acoperă totul cu un strat de lac. Metoda este greoaie;

— sigilarea cu ceară, pe lîngă că nu asigură o etanșeizare perfectă, este și greu de manevrat ulterior, la desfacere.

Evitarea uscării mediilor în scopul conservării culturilor bacteriene se poate realiza și prin metoda DARANEY, prin care germenii se însămînțează pe un mediu solid, ușor înclinat, astfel încît unghiul pe care-l formează mediul față de pereții eprubetei să nu depășească 45°. După dezvoltarea culturii aceasta se acoperă cu parafină lichidă sterilă. Stratul de parafină trebuie să depășească cu cîțiva milimetri limita superioară a mediului.

S-a observat că unele specii se pot conserva foarte bine păstrîndu-și toate însușirile caracteristice speciei, prin uscare. Aceasta se poate realiza, fie la temperaturi peste 0°C, fie la temperaturi joase.

Uscarea la peste 0°C se practică mai des pentru speciile bacteriene sporulate. În acest scop, se introduc în cultură fire de mătase sau bu-

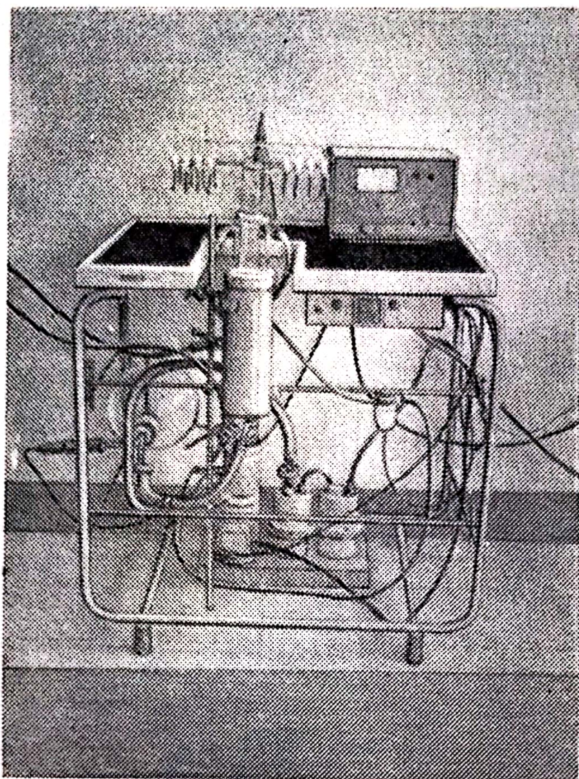


Fig. 154 — Aparat de liofilizat de capacitate mică

cățele de burete sterile, care apoi se usucă prin evaporare lentă, la exicator sau în vid, în aer steril. Se pot folosi ca suport pentru spori și nisipul sau pămîntul sterilizat în prealabil.

Uscarea la temperaturi joase este cuplată de cele mai multe ori cu folosirea vidului, purtînd denumirea de *liofilizare*. Această metodă este la ora actuală una din cele mai larg folosite, atît pentru suspensii bacteriene, virale sau de altă natură, cît și pentru alte produse biologice (vaccinuri, seruri, proteine etc.). Liofilizarea se realizează cu ajutorul unor aparate speciale, mai mult sau mai puțin complexe, dar care trebuie să permită, în principiu, deshidratarea în condiții de presiune negativă, de temperatură cît mai joasă și de sterilitate. Pentru liofilizare se folosesc fiole sau flacoane speciale, sterile, care pot fi închise etanș la terminarea operațiunii. „Vidul" se realizează cu ajutorul unor pompe de vacuum, care funcționează pe toată durata liofilizării, realizînd de fapt deshidratarea materialului respectiv și eliminarea vaporilor. Temperatura scăzută se realizează, fie cu ajutorul unor recipiente cu gheață carbonică, în care fiolele sau flacoanele sînt puse, fie prin simplul proces de evaporare, care, decurgînd cu absorbție de căldură, determină automat scăderea temperaturii și prin condensarea vaporilor din atmosferă, formează un strat de gheață ce se menține pe tot parcursul liofilizării. Congelarea este necesară pentru ca deshidratarea să se producă lent și progresiv. După terminarea procesului (indicat, fie de dispozitive speciale, fie de desprinderea stratului de gheață de pe pereții externi ai fiolelor), fiolele se închid (cu ajutorul flăcării, preferabil cu oxigen) și se controlează apoi vidul din interior, folosindu-se dispozitive speciale cu curenți de înaltă frecvență (pentru buna conservare a materialului liofilizat este nevoie de vid în fiole).

Fiolele cu materiale biologice liofilizate se păstrează în general, la frigider (+4°C) sau la congelator (sub 0°C).

Luminozitatea redusă, preferabil întuneric total, este necesară pentru o bună conservare, deoarece se evită acțiunea nocivă a radiațiilor luminoase și contribuie la sistarea proceselor vitale. În acest scop, se recurge la camere întunecoase (camuflate) dulapuri, frigidere sau congelatoare, în funcție de temperatura la care culturile respective se păstrează.

Mediile de cultură optime pentru conservarea tulpinilor bacteriene diferă cu specia (tabelul 10).

Tabelul 10

Medii de cultură pentru conservarea bacteriilor

Nr. crt.	Genul sau specia bacteriană	Mediul optim pentru conservare	Temperatura optimă (°C)	Intervalul optim de transplantare
1	*Actinobacillus lignieresi*	Bulion	+18	10 zile
2	*Actinobacillus mallei, Brucella*	Cartof glicerinat	+18	30 zile
3	*Bacillus*	Agar înclinat	+18	cîţiva ani
4	*Clostridium*	Geloză Veillon	+18	cîţiva ani
5	*Corynebacterium*	Bulion sau bulion cu ser în funcţie de specie	+18	30—60 zile
6	*Erisipelothrix, Listeria*	Bulion	+4	60 zile
7	*Leptospira*	Mediul Korthoff	+18	14—20 zile
8	*Mycobacterium*	Mediul Löwenstein-Jensen sau cartof glicerinat	+18	90 zile
9	*Necrobacterium necrophorum*	Bulion cu carne şi ser	+18	6 zile
10	*Pasteurella multocida*	Bulion	+18	30 zile
11	Stafilococi şi colibacili, salmonele, proteus	Agar moale	+4	90 zile
12	Streptococi	Bulion cu ser	+4	30 zile

Conservarea unor culturi microbiene inactivate

Se poate realiza cu ajutorul formolului, care pe lîngă că inactivează cultura în cauză, o fereşte de contaminarea cu germeni nedoriţi din mediul ambiant. Se folosesc mai multe posibilităţi.

— În cazul culturilor în tuburi, se poate îmbiba partea inferioară a dopului de vată cu formol, după care se astupă cu el tubul cu cultură. Germenii sînt inactivaţi în decurs de 24—48 de ore.

— În cazul culturilor în plăci Petri, se îmbibă o bucată de hîrtie de filtru în formol şi se aşază în interiorul capacului. După două zile se scoate hîrtia şi se etanşeizează capacul plăcii cu parafină.

— Se poate recurge, în cazul suspensiilor bacteriene şi la adăugarea de formol în proporţie de 0,1—0,2%.

Conservarea virusurilor

Un diagnostic corect al diferitelor infecții virale, precum și o identificare corespunzătoare a agenților virali în cauză, este strîns legată și de o bună conservare a materialului infecțios în care aceștia se găsesc. În acest sens au fost aplicate în timp o serie de modalități, dintre care unele sînt azi mai puțin folosite în timp ce altele au devenit indispensabile. Astfel, dacă conservarea prin treceri succesive pe animale sensibile este un procedeu de excepție, conservarea prin congelare și liofilizare sînt mijloace cotidiene în majoritatea laboratoarelor de specialitate.

Conservarea prin congelare este frecvent folosită în special pentru materialele infecțioase care urmează a fi inoculate (probe de materii fecale, fragmente de organe virulente) ca și pentru păstrarea diferitelor tulpini virale, necesare trecerilor ulterioare. Temperaturile de minus 20—30°C necesare în acest scop se pot obține fie prin congelatoare speciale, fie cu ajutorul gheții carbonice și alcoolului, menținute în vase Dewar de 5—10 l, bine etanșeizate. În acest din urmă caz, fiolele cu material trebuie închise la flacără. Un dezavantaj al metodelor bazate pe congelare este însă că, în special în cazul lichidelor embrionare, se diminuează substanțial titrul hemaglutinant. Pentru acest motiv antigenele folosite în reacții de hemaglutinare nu se păstrează în acest fel.

Conservarea prin glicerină la + 4°C este una din cele mai comode metode, mai ales în cazul fragmentelor de organe virulente. Prin acest procedeu majoritatea virusurilor își mențin nealterate însușirile (antigenitatea, patogenitatea) luni sau chiar ani de zile. Trebuie subliniat că rickettsiile nu rezistă în aceste condiții decît cîteva zile.

Pentru conservare se introduc fragmente mici de țesuturi (2—4 cm) în recipiente conținînd glicerină sterilă și neutră, în cantități suficiente pentru a împiedica contactul țesutului cu aerul. Prepararea glicerinei neutre (tamponate) se face astfel (metoda Lépine):

— Soluția A
  — difosfat de sodiu p.a. 179,12 g
  — apă distilată 500 ml

Soluția poate cristaliza la temperatura camerei, de aceea pentru redizolvare se reîncălzește ușor înainte de întrebuințare.

— Soluția B
  — monofosfat de potasiu p.a. 68,08 g
  — apă distilată 500 ml

În momentul preparării glicerinei tamponate se determină întîi pH-ul glicerinei, diluînd o cantitate de glicerină cu aceeași cantitate de apă distilată neutră și folosind una din metodele curente.

Pentru glicerina slab acidă (pH peste 5,5) se va folosi:
— soluția A 3,5 ml
— soluția B 1,5 ml
— apă distilată 95 ml
— glicerină 100 ml

Pentru glicerina puternic acidă (pH sub 5,5) se va folosi:
— soluție A 8 ml
— soluție B 2 ml

— apă distilată 90 ml
— glicerină 100 ml

Glicerina astfel preparată va fi repartizată în recipiente de 20—50 ml închise cu dopuri de vată și tifon și se va steriliza la autoclav.

Preparată în acest fel, glicerina poate fi folosită vreme îndelungată. Deoarece atît glicerina cît și fosfații au o acțiune nocivă asupra diferitelor țesuturi și în special asupra sistemului nervos central, înainte de folosire pentru inocularea la animale a unor asemenea materiale, ele vor trebui să fie bine spălate în soluție fiziologică sterilă.

Conservarea prin liofilizare se face după procedeul expus. Trebuie specificat însă că unele virusuri necesită condiții speciale de liofilizare, pentru a-și păstra proprietățile. De asemenea, este util să se sublinieze că în cursul manevrărilor legate de liofilizare este necesar să se respecte cu rigurozitate condițiile de sterilitate, atît pentru a împiedica contaminarea produsului respectiv cu germeni bacterieni sau miceți, cît și pentru a preîntîmpina contaminarea mediului cu virus.

Datorită faptului că prin procesul de sublimare a apei, din cursul liofilizării, în pulberea virulentă rămîn și sărurile care au intrat în structura lichidului în care s-a realizat suspensia, resuspendarea produsului liofilizat se face întotdeauna în apă distilată, într-o cantitate echivalentă celei inițiale.

Conservarea serurilor imune

Se poate face prin mijloace fizice și chimice.

— Conservarea prin mijloace fizice presupune păstrarea la temperaturi scăzute (+4°C sau congelare și liofilizare). Prin păstrarea la +4°C se poate realiza o durabilitate de cîțiva ani. Congelarea se face la —20°C —60°C. Liofilizarea este una din metodele care în ultimii ani a luat o extindere din ce în ce mai mare în laboratoarele de specialitate.

— Conservarea prin mijloace chimice constă în adăugarea unor substanțe antiseptice cum ar fi fenolul (0,3—0,5%), chinosolul (0,05%), mertiolatul de sodiu (1/10 000—1/20 000) etc. Aceștia nu au efect distructiv asupra anticorpilor din ser.

Conservarea alexinei

Ca și în cazul serurilor, se poate realiza fie prin mijloace fizice, fie cu ajutorul substanțelor chimice.

— Mijloacele fizice constau în păstrarea la +4°C, congelare și liofilizare.

— Mijloacele chimice presupun folosirea unor substanțe cu rol conservant. Astfel pot fi amintite:

— fenolul cristalizat 0,4 g + 1,0 g NaCl chimic pur, la 10 ml ser proaspăt de cobai (conținînd alexină). Se agită zilnic pînă cînd substanțele se dizolvă; se conservă la frigider la +4°C;

— o soluţie de 3,0 g acid boric + 17,0 g NaCl + 100 ml apă adăugată serului de cobai în proporţie de 1/10;

— o soluţie de sulfat de sodiu 10% şi acid boric 4%, amestecate în părţi egale cu serul de cobai;

— o soluţie preparată din 12,0 g acetat de sodiu şi 4,0 g acid boric la 100 ml; se foloseşte în părţi egale cu serul de cobai de conservat.

Conservarea frotiurilor

Diferite considerente impun conservarea frotiurilor în timp. Aceasta se poate face în stare colorată sau necolorată. În acest din urmă caz, este necesară însă fixarea prin unul din mijloacele adecvate, în funcţie de natura frotiurilor.

Indiferent de starea în care urmează a fi conservate, este necesar să se aleagă locuri uscate, ferite de praf şi de lumină, mai ales de razele solare. Este preferabil să se pună în cutii speciale, cu rastel, în care să existe şi posibilitatea de identificare rapidă (notare exterioară).

Dacă se doreşte păstrarea unui frotiu care a fost examinat la imersie, se şterge oleul de cedru, cu ajutorul unui tampon cu vată, tifon sau hîrtie de filtru îmbibate cu xilol, după care se usucă şi se pune la păstrare. Montarea în balsam de Canada, deşi realizează o bună protecţie mecanică, accelerează decolorarea frotiurilor şi în acest caz nu este posibilă o recolorare (în cazul frotiurilor decolorate, nemontate, acest lucru este uşor de realizat).

Prepararea unor soluţii, coloranţi şi reactivi de laborator de uz curent

1 – Coloranţi şi soluţii folosite în colorări

Soluţiile colorante de bază sînt în general soluţii alcoolice saturate şi se prepară astfel:

— alcool 96°	100,0 ml
— colorant	10,0 — 15,0 g

Se mojarează colorantul cu o parte de alcool şi apoi se adaugă treptat restul alcoolului, căutînd să se realizeze o omogenizare cît mai temeinică a colorantului de pe pereţii mojarului. Amestecul se ţine cîteva zile la termostat pentru maturare, în flacoane închise etanş, agitînd din cînd în cînd. Apoi se păstrează la temperatura camerei, la adăpost de lumină. Din această soluţie de bază se prepară soluţiile apoase.

Soluţia de fucsină fenicată concentrată (Ziehl)

— soluţie de bază de fucsină, filtrată	10,0 ml
— fenol (acid carbolic lichefiat)	5,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

Soluţia de fucsină fenicată diluată

— soluţie de fucsină fenicată concentrată	10,0 ml
— apă distilată	90,0 ml

Soluţia de violet de Genţiană

— violet de Genţiană, soluţie de bază	10,0 ml
— fenol (acid carbolic lichefiat)	1,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

Soluţia Lugol

— iodură de potasiu	2,0 g
— iod metalic	1,0 g
— apă distilată pînă la	300,0 ml

Se dizolvă mai întîi iodura de potasiu într-o parte de apă distilată, se adaugă iodul, iar apoi se completează cu apa distilată pînă la 300 ml. Soluţia se păstrează la adăpost de lumină, deoarece sub acţiunea acesteia se formează acid iodic, care-i conferă o reacţie acidă. Dacă în timp pH-ul se modifică spre aciditate, se neutralizează cu bicarbonat de sodiu.

Soluţia de albastru de metilen alcalin (Löffler)

— albastru de metilen, soluţie de bază	30,0 ml
— hidroxid de potasiu, soluţie 1%	1,0 ml
— apă distilată	100,0 ml

Soluția de albastru de metilen diluată

— soluție de albastru de metilen Löffler	10,0 ml
— apă distilată	90,0 ml

Amestecul decolorant alcool-acetonă (pentru colorația Gram)

— alcool 96°	3 părți
— acetonă	1 parte

Amestec decolorant pentru acido-alcalo-rezistenți (alcool-acid)

— alcool 70°	97,0 ml
— acid clorhidric concentrat	3,0 ml

Soluția colorantă May-Grünwald

— eozinat de albastru de metilen	1,0 g
— glicerină neutră p.a.	50,0 ml
— alcool metilic p.a.	100,0 ml

Soluția colorantă Giemsa

— eozinat de azur de metilen	3,0 g
— azur de metilen	0,3 g
— glicerină neutră p.a.	250,0 ml
— alcool metilic	200,0 ml

Se încălzește glicerina la 60 °C, se adaugă pe rînd cele două substanțe colorante, perfect uscate și pulverizate. Se agită pînă la dizolvare, se încălzește din nou la 60°, se adaugă alcoolul metilic. Se agită și se filtrează după 24 de ore. Păstrarea se face în sticle colorate, etanș închise.

Soluția de hematoxilină (Mayer)

— hematoxilina	1,0 g
— iodat de potasiu	1,0 g
— alaun de potasiu	50,0 g
— apă distilată pînă la	1 000,0 ml

Se dizolvă mai întîi alaunul în apă, apoi se adaugă hematoxilina. După dizolvarea acesteia se adaugă iodatul de sodiu, care produce oxidarea rapidă a hematoxilinei. Soluția se lasă să se matureze timp de 3—4 zile, după care se filtrează.

Soluția de hematoxilină ferică (Heidenheim)

Soluția A:

— hematoxilină	1,0 g
— alcool 96°	100,0 g

Soluția B:

— perclorură de fier	4,0 ml
— acid clorhidric 25%	1,0 ml
— apă distilată	95,0 ml

Se amestecă în părți egale soluțiile A și B, înainte de întrebuințare.

Soluția de eozină (sol. apoasă 1%)

— eozină	1,0 g
— apă distilată ad	100,0 ml

Soluția de eozină-eritrozină

— eozină	0,1 g
— eritrozină	0,1 g
— apă distilată	100,0 ml
— acid acetic glacial	1 picătură
— timol	1 cristal

Soluția de eritrozină-oranj G

— eritrozină 0,5 g
— oranj G 0,25 g
— apă distilată ad 100,0 ml

Soluția de verde luminos

— verde luminos cristalizat 0,5 g
— apă distilată 100,0 ml

Soluția de acid fosfomolibdenic

— acid fosfomolibdenic 1,0 g
— apă distilată 100,0 ml

Soluția de picrofucsină

— soluție apoasă de acid picric 100,0 ml
— fucsină acidă sol. 1% 5—10 ml

Soluția resorcin-fucsină

— fucsină bazică 2,0 g
— apă distilată 200,0 ml

Se adaugă 4,0 g resorcină și se fierbe într-o capsulă de porțelan, amestecîndu-se continuu. Se adaugă 25,0 ml perclorură de fier și se fierbe în continuare 2—5 minute. După răcire se filtrează. Filtratul se aruncă, iar filtrul cu precipitatul se aduc din nou în capsula de porțelan și se adaugă 200 ml alcool de 95°. Se amestecă continuu pînă la dizolvare completă. Se filtrează și se completează pînă la 200 ml cu alcool 95°. Se adaugă 4 ml acid clorhidric 25% (oficinal).

Soluția de Sudan III

— Sudan 0,1 g
— alcool 40° 100,0 ml

Amestecul se fierbe și se agită continuu, pînă la completa dizolvare, apoi se răcește și se filtrează.

Soluția de albastru de toluidină fenicată

— albastru de toluidină 5,0 g
— alcool absolut 100,0 ml
— apă distilată 500,0 ml
— soluție de fenol 5% 500,0 ml

Soluția de lactofenol — Wasserblau

— fenol cristalizat 20,0 g
— acid lactic 20,0 g
— glicerină 40,0 g
— Wasserblau 0,1 g
— apă distilată 20,0 g

Soluția de verde de metil-pyronină

— verde de metil cristalizat 0,15 g
— pyronină 0,25 g
— alcool 96° 2,5 ml
— glicerină 20,0 ml
— fenol 0,5% ad 100,0 ml

2 – Soluții tamponate

Soluția fiziologică de clorură de sodiu

— $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 3,22 g (0,009 m)
— KH_2PO_4 0,82 g (0,006 m)

— NaCl 7,89 g (0,135 m)
— apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția tampon veronal-acetat (pH = 7,35)

Soluția veronal-acetat:

— acetat de sodiu (3 H_2O) N/7 9,714 g
— veronal sodic M/7 14,714 g
— apă distilată 500,0 ml

Din această soluție se prepară tamponul astfel:

— soluție veronal-acetat 250,0 ml
— NaCl 4,25% 200,0 ml
— HCl N/10 217,0 ml
— apă distilată 683,0 ml

Soluția Eagle de bază

— NaCl 170,0 g
— KH_2PO_4 2,7 g
— $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 11,3 g
— apă distilată ad 1 000,0 ml

Din aceasta se prepară soluția de lucru astfel:

— soluție Eagle de bază 50,0 ml
— apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția tampon-fosfat M/15 de bază

Soluția A:

— KH_2PO_4 9,078 g
— apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția B:

— $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ 11,876 g
— apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluțiile de lucru se prepară prin amestecarea soluției de bază A și B în proporții variabile în funcție de pH-ul dorit.

Tabelul 11

Prepararea soluției tampon-fosfat cu pH-ul dorit

Soluția A	Soluția B	pH-ul la 20°C
100 ml	12,1	6,0
,,	18,4	6,2
,,	26,4	6,4
,,	37,2	6,6
,,	49,2	6,8
,,	61,2	7,0
,,	72,6	7,2
,,	81,8	7,4
,,	88,5	7,6
,,	93,6	7,8
,,	96,9	8,0

Soluția de apă tamponată pentru hematologie

— fosfat monopotasic (PO_4H_2K) 0,49 g
— fosfat bisodic (PO_4HNa_2) 1,14 g
— apă distilată 200,0 ml

Soluţia are un pH de 7,2. Înainte de folosire se diluează 1/10 (o parte soluţie tampon şi 9 părţi de apă distilată).

3 – Soluții izotonice

Soluția Alsever

— Citrat de sodiu · 2 H_2O 8,0 g
— NaCl 4,2 g
— Glucoză 20,5 g
— Acid citric soluţie 10% (acid citric · H_2O) 8,0 ml
— Apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția Locke

— NaCl 9,0 g
— $CaCl_2$ 0,2 g
— Na_2HCO_3 0,2 g
— KCl 0,5 g
— Glucoză 2,0 g
— Apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția Ringer

— NaCl 9,0 g
— $CaCl_2$ 0,2 g
— KCl 0,2 g
— Apă distilată ad 1 000,0 ml

Soluția Tyrode

— NaCl 8,0 g
— $CaCl_2$ 0,2 g
— KCl 0,2 g
— $MgCl_2$ 0,1 g
— NaH_2PO_4 0,05 g
— Na_2HCO_3 1,0 g
— glucoză 1,0 g
— apă distilată ad 1 000,0 ml

4 – Soluții indicatoare

Principalele caracteristici, ca şi modul de preparare a soluţiilor indicatoare cele mai frecvent folosite sînt redate în tabelul 12.

Tabelul 12

Soluții indicatoare mai frecvent folosite

Indicatorul	Preparare				Cantități necesare la 10 ml sol cercetat	Culoarea		
	Indicator g	NaOH n/100 ml	Alcool 96°/ml	Apă dist. ml ad		Mediu acid	Limite de viraj	Mediu alcalin
Albastru de timol	0,1	—	—	250	5	Roșu	1,2—2,8	Galben
Benzyl oranj	0,1	—	—	1 000	3—6	Roșu	1,9—3,3	Galben
Metil oranj	0,1	—	—	1 000	3—5	Roșu	3,1—4,4	Galben oranj
Albastru de brom fenol	0,1	14,9	—	250	5	Galben	3,0—4,6	Violet
Verde brom crezol	0,1	14,3	—	250	5	Galben	3,8—5,4	Albastru
Roșu metil	0,1	—	300	500	2,4	Roșu	4,2—6,3	Galben
Brom crezol purpur	0,1	18,5	—	250	5	Galben	5,2—6,8	Purpur
Albastru de brom timol	0,1	16,0	—	250	5	Galben	6,0—7,6	Albastru
Roșu neutru	0,02	—	100	200	10—20	Roșu	6,8—8,0	Galben
Roșu fenol	0,1	28,2	—	250	5	Galben	6,4—8,2	Roșu
Roșu crezol	0,1	26,2	—	250	5	Galben	7,8—8,8	Roșu
Albastru de timol	0,1	21,5	—	250	5	Galben	8,0—9,6	Albastru
Fenolftaleină	0,1	—	100	200	230	Incolor	8,3—10,0	Roșu
Timolfenolftaleină	0,1	—	125	210	310	Incolor	9,3—10,5	Albastru
Galben alizarină	0,025	—	—	250	510	Galben	10,1—12,1	Roșu

Amestec indicator pentru pH 7,0

— soluție roșu neutru 0,1% în alcool — 1 parte

— albastru de metilen 0,1% în apă — 1 parte

Indicatorul este albastru-violet la pH 7,0 și devine verde la pH mai ridicat.

5 – Alți reactivi de laborator

Reactivi pentru punerea în evidență a indolului

Se prepară conform tabelului 13.

Tabelul 13

Prepararea reactivilor pentru punerea în evidență a indolului

Componenți	Reactivul Ehrlich Böhme	Modificat Pringsheim	Modificat Kovacs	Reactivul Kovacs Hoffman	Soluție pentru impregnarea hîrtiei reactiv (Gillies)
Para-dimetilamino bezaldehidă	1,0	1,0	5,0	5,0	5,0
Alcool metilic	—	10,0	—	—	50,0
Alcool etilic 95%	95,0	—	—	—	—
Alcool amilic chimic pur	—	—	75,0	—	plus 10,0 acid fosforic
Alcool butilic	—	—	—	75,0	
Acid clorhidric	20,0	8,0	25,0	25,0	
Cantitatea de reactiv necesară pentru 5 ml cultură în apă peptonată	3 picături	3 picături	3 picături	1 ml	

Reactivul Griess-Ilosvay

Reactivul 1:

— alfanaftolamină 1,0 g
— apă distilată 22,0 ml

Amestecul se încălzește, se filtrează și se adaugă 1 ml acid acetic diluat în proporție de 4 ml acid acetic glacial în 7 ml apă.

Reactivul 2:

— acid sulfanilic 0,5 g
— acid acetic diluat 150,0 ml

Reactivul Schiff. Se dizolvă 1,5 g fucsină acidă în 300 ml apă distilată fierbinte. Se filtrează prin hîrtie Whatmann la 55°C. Soluției răcite la 40°C i se adaugă 25 ml HCl 2N și 375 g metabisulfit de sodiu. Se agită pentru o dizolvare rapidă. Se completează la 500 ml cu apă distilată. Se pune pentru 16 ore la frigider, în flacon brun, după care se adaugă 2,5 g cărbune activ Merck și se lasă în contact timp de 10 minute. Se filtrează rapid (2—3 minute) prin hîrtie Whatmann sau altă hîrtie de filtru de calitate. Soluția trebuie să fie incoloră sau cu o ușoară nuanță galbenă. Dacă culoarea este roșie, este inutilizabilă. Înainte de utilizare, se lasă să se încălzească la temperatura camerei.

Apa de Javelle. Se dizolvă 50 g $CaOCl_2$ în 600 ml apă distilată fierbinte. Se agită și se adaugă 270 ml dintr-o soluție 20% KCO_3, se fierbe pentru a îndepărta eventualul amoniac (la 90°C pentru scurt timp). Se răcește și se completează cu apă distilată la 1000 ml. Se încearcă chimic dacă există ioni de calciu liber; dacă sînt, se încălzește soluția și se mai adaugă clorură de calciu. Se filtrează și se păstrează în sticle brune.

— *Soluția Berthelot*

— $SO_4Mn\ 7\ H_2O$	2,0 g
— $SO_4Ca\ 2\ H_2O$	0,5 g
— $Cl_2Ni_6H_2O$	0,05 g
— $Cl_2CO_6H_2O$	0,05 g
— $(SO_4)_2Ti_2$	0,20 g
— $SO_4\ 2n\ 7\ H_2O$	0,10 g
— $SO_4Cu\ 5\ H_2O$	0,05 g
— $SO_4K_2\ 4\ H_2O$	0,10 g
— H_2BO_3	0,05 g
— H_2SO_4	1,0 ml
— $(SO_4)_3\ Fe_2$	50,0 g
— Apă distilată	1 000,0 ml

6 – Diverse

Prepararea extractului de drojdie. Se suspensionează 50 g drojdie proaspătă în 100 ml soluție de monofosfat de potasiu (KH_2PO_4) 0,2 M, se încălzește la 80—85°C, timp de 20 minute, se filtrează prin Seitz. Se conservă în stare congelată.

Se poate prepara și din drojdie uscată. La 1 l apă distilată se adaugă 25 g drojdie uscată, se încălzește la fierbere, se filtrează prin două straturi de hîrtie de filtru și se ajustează pH-ul la 8,0, cu o soluție de NaOH, după care se centrifughează la 2000—3000 T/m, timp de o oră. Supernatantul se sterilizează prin filtrare prin Seitz și se conservă la —20°C.

Prepararea rondelelor îmbibate cu nitrofuran, pentru antibiogramă. Se prepară inițial o soluție de nitrofuran, prin dizolvarea a 100 mg Nitrofuran în 200 ml acetonă. Se îmbibă apoi hîrtie de filtru obișnuită cu soluția de Nitrofuran și se usucă (eventual la raze infraroșii). După uscare se îmbibă din nou și iarăși se usucă. Apoi se taie rondelele cu ajutorul unui perforator de hîrtie. Cantitatea de substanță activă dintr-o rondelă este de cca 8—10 micrograme.

În aceeași manieră se poate recurge la pregătirea de rondele conținînd orice alte chimioterapice sau antibiotice, cu condiția de a le vehicula în solvenți corespunzători și de a asigura concentrația minimă necesară.

Inactivarea serurilor destinate pentru RFC, în vederea distrugerii alexinei proprii. Se face la temperaturi și pe perioade variabile, în funcție de specie:

— Bovine	56°C — 30 minute
— Cabaline	60°C — 20 minute
— Porcine	62°C — 50 minute
— Cîine	65°C — 20 minute
— Iepure	65°C — 20 minute
— Cobai	56°C — 20 minute
— Om	56°C — 20 minute

Prepararea unor soluții stock de antibiotice. Penicilină-streptomicină. La un flacon de 1 000 000 U.I. penicilină G potasică se adaugă 5 ml apă distilată sterilă. La un flacon de 1 g streptomicină sulfat se adaugă 5 ml

apă distilată sterilă. Soluția de streptomicină se transvazează apoi în flaconul cu penicilină, rezultînd concentrația de 100 000 U.I. penicilină și 100 000 micrograme streptomicină/ml. La fiecare litru de mediu se adaugă 1 ml soluție de penicilină + streptomicină, rezultînd o concentrație finală de 100 U.I./ml penicilină și 100 micrograme/ml streptomicină. Dacă soluția urmează să fie utilizată în următoarele 4 zile, ea poate fi păstrată la +4°C, altfel la —20°C. Soluția nu este însă bine să fie congelată și decongelată repetat.

Polimixina B — sulfat. La un flacon de 1 000 000 U. Polimixină se adaugă 10 ml apă distilată sterilă, rezultînd o concentrație de 100 000 U./ml. Se păstrează la +4°C dacă se folosește în decurs de o săptămînă, altfel la —20°C. Din această soluție se adaugă la 1 litru de mediu, 0,5 ml, rezultînd o concentrație de 50 unități/ml.

Stamicina. La un flacon de 500 000 U. se adaugă 10 ml apă distilată sterilă, rezultînd o concentrație de 50 000 U./ml. Se păstrează identic cu Polimixina. La 1 litru mediu se adaugă 1 ml soluție, obținîndu-se o concentrație finală de 50 U./ml.

Prepararea scării Brown. Scara Brown este constituită dintr-o serie de tuburi conținînd suspensii de turbidități diferite, care prin comparație permit stabilirea aproximativă a concentrației în germeni a unor suspensii bacteriene.

Se aleg 10 tuburi de sticlă neutră cu același diametru (7—10 mm diametru).

— Se prepară o soluție 1% $BaCl_2$ și se pune în fiecare tub cîte o cantitate crescîndă, de la 0,1 la 1,0 ml (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 . . . . 1,0 ml).

— Se prepară o soluție de H_2SO_4 1% și se completează în fiecare tub pînă la 10 ml.

— Se astupă tuburile cu dopuri de cauciuc sau se închid la flacără. În tuburi se formează un precipitat alb de sulfat de bariu, care corespunde unei turbidități egale cu:

tubul 1 = 300 milioane germeni
tubul 2 = 600 milioane germeni
tubul 3 = 900 milioane germeni
. . . .
tubul 10 = 300 miliarde de germeni

Prepararea scării McFarland servește aceluiași scop ca și precedenta și se prepară din H_2SO_4 1/10 și $BaCl_2$ 1/20.

Pentru prepararea H_2SO_4 1/10 n se pun 9,8 g H_2SO_4, cu greutate specifică 1,84 în 1000 ml apă. $BaCl_2$ 1/20 n se prepară punînd 12,22 g $BaCl_2 \cdot 2\,H_2O$ în 1000 ml apă distilată.

Tabelul 14

Prepararea soluțiilor necesare scării McFarland

Tubul	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
H_2SO_4 1/10 ml	99	98	97	96	95	94	93	92	91	90
$BaCl_2$ 1/20 ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Turbiditate corespunzătoare la Nr. bacterii/ml	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3 000

Trebuie specificat însă că soluţia nu este stabilă la infinit, aşa încît din timp în timp scara trebuie refăcută.

Lichidul conservant Iores se foloseşte pentru fixarea pieselor anatomice sau anatomopatologice fără a pierde coloraţia diferitelor elemente constitutive. Se compune din două soluţii:

— Soluţia A:

— cloral hidrat	50,0 g
— sulfat de sodiu	50,0 g
— formol	50,0 ml
— apă de robinet	1 000,0 ml

În această soluţie piesele se ţin 10—14 zile, după care se spală timp de 24—48 de ore la apă curentă.

— Soluţia B:

— acetat de potasiu (sau sodiu)	400,0 g
— glicerină	500,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Este soluţia în care piesele se pun definitiv, în borcane corespunzătoare mărimei lor. Cu toate că culorile se conservă destul de bine, piesele vor fi ferite de lumina solară directă.

Lichidul conservant Keiserling se foloseşte de asemenea pentru conservarea pieselor anatomice, cu un aspect cît mai apropiat de cel natural.

— Soluţia A:

— azotat de potasiu (sau sodiu)	15,0 g
— acetat de potasiu	30,0 g
— formol	200,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

În această soluţie, piesele se lasă 1—3 zile, după mărimea lor, după care se spală cu apă şi se scufundă în alcool 90°, într-o cantitate de 3—4 ori mai mare decît volumul piesei. Se ţin 1—3 zile şi se trec apoi în:

— Soluţia B (conservantă):

— acetat de potasiu	250,0 g
— alcool 90°	250,0 ml
— glicerină	1 000,0 ml
— apă distilată	1 000,0 ml

Dacă se doreşte ca din piesele respective să se facă şi secţiuni histopatologice lichidul conservant se înlocuieşte cu un lichid avînd următoarea compoziţie:

— alcool 95°	2 000,0 ml
— glicerină	800,0 ml
— acetat de potasiu	400,0 g
— apă distilată	400,0 ml

Albumina glicerinată (Mayer). Se amestecă în părţi egale glicerină cu albuş de ou. În acest scop, membranele albuminoase se secţionează prealabil cu foarfeca, după care amestecul se filtrează printr-un filtru gros, avîndu-se grija de a se adăuga un cristal de timol care să împiedice dezvoltarea ciupercilor.

Trebuie specificat însă că soluția nu este stabilă la infinit, așa încît din timp în timp scara trebuie refăcută.

Lichidul conservant Iores se folosește pentru fixarea pieselor anatomice sau anatomopatologice fără a pierde colorația diferitelor elemente constitutive. Se compune din două soluții:

— Soluția A:
   - cloral hidrat — 50,0 g
   - sulfat de sodiu — 50,0 g
   - formol — 50,0 ml
   - apă de robinet — 1 000,0 ml

În această soluție piesele se țin 10—14 zile, după care se spală timp de 24—48 de ore la apă curentă.

— Soluția B:
   - acetat de potasiu (sau sodiu) — 400,0 g
   - glicerină — 500,0 ml
   - apă distilată — 1 000,0 ml

Este soluția în care piesele se pun definitiv, în borcane corespunzătoare mărimei lor. Cu toate că culorile se conservă destul de bine, piesele vor fi ferite de lumina solară directă.

Lichidul conservant Keiserling se folosește de asemenea pentru conservarea pieselor anatomice, cu un aspect cît mai apropiat de cel natural.

— Soluția A:
   - azotat de potasiu (sau sodiu) — 15,0 g
   - acetat de potasiu — 30,0 g
   - formol — 200,0 ml
   - apă distilată — 1 000,0 ml

În această soluție, piesele se lasă 1—3 zile, după mărimea lor, după care se spală cu apă și se scufundă în alcool 90°, într-o cantitate de 3—4 ori mai mare decît volumul piesei. Se țin 1—3 zile și se trec apoi în:

— Soluția B (conservantă):
   - acetat de potasiu — 250,0 g
   - alcool 90° — 250,0 ml
   - glicerină — 1 000,0 ml
   - apă distilată — 1 000,0 ml

Dacă se dorește ca din piesele respective să se facă și secțiuni histopatologice lichidul conservant se înlocuiește cu un lichid avînd următoarea compoziție:

- alcool 95° — 2 000,0 ml
- glicerină — 800,0 ml
- acetat de potasiu — 400,0 g
- apă distilată — 400,0 ml

Albumina glicerinată (Mayer). Se amestecă în părți egale glicerină cu albuș de ou. În acest scop, membranele albuminoase se secționează prealabil cu foarfeca, după care amestecul se filtrează printr-un fil gros, avîndu-se grija de a se adăuga un cristal de timol care să împied dezvoltarea ciupercilor.

Creioane de scris pe sticlă. Pentru cca 40 de creioane sînt necesare următoarele:

— ceară de albine, cît mai pură 100,0 g
— seu de bovine (nu ovine) crud şi topit ex tempore 100,0 g
— oxid de zinc chimic pur 500,0 g

Ceara şi seul se topesc bine, într-un vas la baia de apă şi se omogenizează cît mai temeinic. Se adaugă cîte puţin oxidul de zinc, în timp ce se amestecă cu o lingură farmaceutică metalică, pînă la epuizarea intregii cantităţi. Se continuă amestecarea pînă se obţine o pastă omogenă (10—15 minute). În această fază fie că se întinde pe o suprafaţă plană sub formă de lumînări cu un diametru de 6—8 mm, fie că se toarnă în forme (tuburi de sticlă) care apoi se înlătură prin spargere. Solidificarea totală se realizează în cca 2 săptămîni. Creioanele ajustate la lungimea dorită se pot folosi învelite în hîrtie, fixate în tuburi de sticlă sau dispozitive speciale.

Cerneală de scris pe sticlă.

— fucsină bazică (sau alt colorant) 20,0 g
— alcool etilic 96° 200,0 ml

Amestecul se realizează prin mojarare, după care se pune 24 de ore la termostat. În ziua în care se scoate de la termostat se fierb 200 ml apă distilată cu 20 g tanin (acid) pînă scade la cca 1 ml. Se răceşte şi se adaugă amestecul de alcool + colorant. Se ţine 24 de ore la temperatura camerei, se filtrează. Păstrarea se face de preferinţă la frigider.

Anexe

Anexa 1

Mijloace de diagnostic de laborator în principalele entități morbide la animale

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
	A. Boli infecțioase bacteriene	
Antrax	— de la animale în viață: — frotiuri nefixate din sînge sau lichid de edem — de la cadavre: — frotiuri din sînge și edeme — porțiune din ureche — os lung nedeschis — porțiune din splină — porțiune de tumoare — la porci și ganglioni retrofaringieni	— bacterioscopic (Giemsa, Gram) — bacteriologic — serologic — inoculări experimentale — test fagic
Pasteureloza	— cadavre întregi (animale mici și mijlocii) — os lung nedeschis — porțiuni de organe cu leziuni (pulmon, ganglioni, edeme) — frotiuri din organe și sînge	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic — inoculări experimentale (șoareci, porumbei)
Tularemia	— cadavre întregi — porțiuni de organe inclusiv ganglioni regionali — porțiuni de organe în glicerină 30% — sînge	— bacteriologic — serologic (SAL) — inoculări experimentale (șoareci, cobai)
Pseudotuberculoza	— cadavre întregi — organe cu leziuni suspecte inclusiv ganglioni — sînge — porțiuni de organe în formol 10%	— bacteriologic — serologic (SAL) — histopatologic
Salmoneloza mamiferelor	— organe cu leziuni (ficat, vezica biliară, rinichi, splină, ganglioni mezenterici, pulmon) — os lung nedeschis — cadavre întregi (animale mici) — avortoni, învelitori fetale în caz de avort — probe de sînge recoltate la 8–10 zile după avort	— bacteriologic — inoculări experimentale (rareori) — serologic (SAL)

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Salmoneloza la păsări	— păsări adulte sau pui vii cu semne clinice caracteristice — cadavre proaspete — ouă incubate cu embrioni morți — organe suspecte	— bacteriologic — serologic (RHAR, SAR, SAL) — inoculări experimentale
Colibaciloza	— animale tinere în stare preagonică sau — anse intestinale legate — os lung — organe cu leziuni	— bacteriologic — serotipizarea — inoculări experimentale (testul ansei ligaturate pentru patogenitate)
Boala edemelor și enterotoxiemia colibacilară	— intestine (colon helicoidal) cu ganglioni mezenterici	— bacteriologic — serologic
Tuberculoza	— ganglioni și organe lezionate — porțiuni de organe lezionate în fixator	— bacterioscopic (Ziehl-Neelsen) — inoculări (cobai) — histopatologic
Paratuberculoza	— raclate de mucoasă rectală — fecale — sînge — de la cadavre: porțiuni de intestin gros	— bacterioscopic (Ziehl-Neelsen) — bacteriologic — serologic (RFC)
Bruceloza	— avortoni — învelitori fetale — secreții genitale — organe cu leziuni — sînge — lapte suspect — spermă	— bacterioscopic (Köster) — bacteriologic — serologic (RHAR, SAL, RFC lactoaglutinarea) — inoculări experimentale
Vibrioza	— tampoane cu secreții genitale — avortoni — învelitori fetale, cadavre miei	— bacterioscopic cecum (Gram) — bacteriologic
Leptospiroza	— sînge — urină în faza de leptospirurie, avortoni, învelitori — organe cu leziuni în fixator	— bacterioscopic direct, Tribondeau-Fontana — inoculări — histopatologic
Listerioza	— cadavre de animale mici — cap sau creier de la animalele cu tulburări nervoase la ovine — organe cu leziuni la alte specii	— bacteriologic — inoculări
Botulism	— probe de furaje suspecte	— inoculări
Necrobaciloză	— organe interne lezionate — secreții purulente	— bacterioscopic — bacteriologic
Actinomicoza Actinobaciloza	— secreții purulente — organe lezionate	— bacterioscopic — bacteriologic

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Dizenteria anaerobă a mieilor Enterotoxiemia oilor	— cadavre întregi — anse de intestin legate	— bacterioscopic — bacteriologic — proba toxicității conținutului intestinal și a neutralizării
Bronhopneumonia	— pulmon cu leziuni recente, ganglioni mediastinali — porțiuni de pulmon în fixator	— bacteriologic — virusologic — histopatologic
Piobaciloza porcului	— secreții purulente recoltate din abcese nedeschise	— bacteriologic
Limfadenita cazeoasă a oii	— secreții din abcese nedeschise	— bacterioscopic — bacteriologic
Streptococia porcilor	— organe cu leziuni — secreții articulare	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic
Piemia streptococică a mînjilor	— organe lezionate — lichide articulare, conținutul abceselor nedeschise	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic
Streptococia păsărilor	— organe lezionate	— bacteriologic
Micoplasmoza aviară	— cadavre	— bacteriologic — serologic — histopatologic
Cărbunele emfizematos	— porțiuni de tumoare emfizematoasă, os lung, fragmente de organe	— bacterioscopic — bacteriologic — inoculări
Mamitele infecțioase	— secreție lactată	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic, micologic
Gurma	— secreții purulente din abcese nedeschise	— bacterioscopic (Gram) — bacteriologic
Morva	— conținut din chiști morvoși — secreții — sînge	— bacteriologic — inoculări — serologic (RFC)
Rujet	— organe interne (ficat, rinichi, os) — vegetații endocardice — articulații afectate	— bacterioscopic — bacteriologic — inoculări
	B. Boli produse de rickettsii și chlamidii	
Febra Q	— placenta în caz de avort — secreții uterine — avorton — sînge	— microscopic (Stamp, Macchiavello etc.) — izolare pe ouă embrionate, inoculări — serologic
Conjunctivita rickettsiană a rumegătoarelor	— raclate conjunctivale	— microscopic (Giemsa, Macchiavello, Stamp)

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Avortul chlamidian	— avortoni — învelitori foetale — secreții genitale — sînge după 10 zile de la avort	— microscopic (Stamp) — izolare pe ouă embrionate — inoculări — serologic (RFC)
	C. Boli produse de virusuri	
Turbare	— creier (cap)	— microscopic (Lenz, Mann) din amprenta — histopatologic — inoculări
Boala lui Aujeszky	— animale mici — sistem nervos central la cele cu tulburări nervoase — porțiuni de pulmon, ficat, splină, rinichi la animale mari — avortoni în caz de avort	— inoculări iepure — izolare pe culturi celulare
Variolele mamiferelor	— cruste proaspete sau uscate — țesuturi lezionate în fixator	— izolare pe culturi celulare — histopatologic — inoculări
Difterovariola aviară	— țesuturi lezionate — țesuturi lezionate în fixator	— izolare pe culturi celulare — inoculări — histopatologic
Febra aftoasă	— lichid aftos — epitelii lezionate recoltate steril — epitelii în fixator	— izolare — inoculări — serologic — histopatologic
Stomatita veziculoasă	— țesuturi lezionate — lichid vezicular	— izolare — serologic (RFC)
Ectima contagioasă a oii	— cruste — țesuturi lezionate în fixator	— izolare — histopatologic
Leucoza bovină	— sînge — țesuturi lezionate în fixator	— hematologic — serologic — histopatologic
Anemia infecțioasă a calului	— sînge — porțiuni de ficat recoltate prin biopsie — porțiuni de ficat, splină — un os lung	— testul Coggins — hematologic — histologic — bioprobă
Boli respiratorii cabaline	— porțiuni de pulmon afectate — secreții ale căilor respiratorii — sînge	— izolare virusuri — serologic (RFC)
Pesta porcină	— cadavre — organe interne cu leziuni	— izolare virus — inoculări
Exantemul veziculos al porcului	— lichid vezicular, epitelii — sînge	— izolare virus — serologic (RFC)

Entitatea morbidă	Materialele patologice ce se folosesc pentru diagnostic	Examenul de laborator ce se aplică
Pseudopesta aviară	— cadavre — organe cu leziuni (creier)	— izolare virus — examen serologic — histopatologic
Laringotraheita infecțioasă	— mucoasă trahealä în fixator	— histopatologic
Bronșita infecțioasă	— organe lezionate (pulmon, ovare) — sînge	— izolare virus — serologic (RHAR, SAL)
Encefalomielita aviară	— cadavre — creier	— histopatologic — izolare virus
Leucozele aviare	— sînge — cadavre — organe lezionate — organe lezionate în fixator	— hematologic — histopatologic
Hepatita virotică a bobocilor	— cadavre	— izolare virus
Mixomatoza iepurilor	— cadavre — mixoame — porțiuni de țesuturi lezionate în fixator	— izolare virus — histopatologic

Anexa 2

Unele caractere ale celor mai importanți agenți bacterieni

Genul	Specia	Însușiri	Importanța etiologică
Pseudomonas	*aeruginosa pyocyanea*	Gr. neg., mobil, aerob, bastonașe subțiri, nesporulat, pigmentogen, hemolitic	Afecțiuni ale aparatului digestiv, genital Germen de asociație în supurații
Campylobacter (Vibrio)	*foetus*	Gr. neg., mobil, anaerob bastonașe în formă de virgulă sau S	Avorturi, infecții genitale
Escherichia	*coli*	Gr. neg., în general, mobil, aerob, bastonașe polimorfe, capete rotunjite	Septicemii, tulburări digestive (enterotoxiemia), genitale, mamare
Aerobacter	*aerogenes cloacale*	Gr. neg., imobil respectiv mobil, aerob, bastonașe scurte	Germeni obișnuiți ai florei intestinale
Klebsiella	*pneumoniae*	Gr. neg., imobil, aerob, capsulat, bastonașe scurte	Infecții ale aparatului respirator, urogenital, septicemii, mamite
Serratia	*marcescens (B. prodigiosum)*	Gr. neg., mobil, aerob, pigmentogen (roșu)	Biofit, germen al plăgilor și de putrefacție

Genul	Specia	Însuşiri	Importanţa etiologică
Proteus	*vulgaris rettgeri, morgani, mirabilis*	Gr. neg., mobil, aerob, bastonaşe scurte	Enteropatii (biofit, germen de putrefacţie)
Salmonella	diferite specii	Gr. neg., mobil, aerob, bastonaşe variabile. Diferenţiere prin seroaglutinare	Septicemii la tineret. Avorturi, enterite, toxiinfecţii alimentare
Shigella	*dysenteriae flexneri sonnei*	Gr. neg., imobil, aerob, bastonaşe scurte	Disenterie. Toxiinfecţii alimentare
Pasteurella	*multocida hemolytica pseudotuberculosis tularensis*	Gr. neg., imobil, aerob, colorat bipolar, cocobacilar	Septicemii (holera), infecţii generalizate şi localizate la mamifere, infecţii secundare respiratorii Pseudotuberculoza, tularemia
Brucella	*melitensis abortus, suis ovis*	Gr. neg., imobil, aerob (anaerob) cocobacili foarte fini	Avorturi, septicemii, spondilartrite, orhite
Haemophilus	*influenzae suis gallinarum*	Gr. neg., imobil, aerob, cocobacili fini	Germeni de asociaţie în bolile respiratorii
Actinobacillus	*lignieresi equuli mallei*	Gr. neg., imobil, aerob, cocoid, cocobacilar	Agentul actinobacilozei, paraliziei mînjilor, morvei
Sphaerophorus	*necrophorus*	Gr. neg., imobil, anaerob, bastonaşe subţiri cu filamente	Biofit, produce procese necrobacilare podale, bucale şi organice la diferite specii
Micrococcus	*luteus roseus, flavus pyogenes epidermidis*	Gr. poz., imobil, aerob, pigmentogen, coci dispuşi neregulat	Condiţionat patogen, supuraţii
Staphylococcus	*aureus citreus albus*	Gr. poz., imobil, aerob, pigmentogen, coci dispuşi neregulat	Supuraţii, piemii, mastite, toxiinfecţii alimentare
Diplococcus	*pneumoniae*	Gr. poz., imobil, aerob, sferoid sau lanceolat	Pneumonii, septicemii la viţei
Streptococcus	*equi pyogenes agalactiae* şi alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, sferoid în lanţuri	Supuraţii, septicemii, mamite, gurmă
Corynebacterium	*pseudotuberculosis pyogenes* şi alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, cocoid sau virguliform	Pseudotuberculoză, supuraţii. Piobaciloza, mamite

Genul	Specia	Însuşiri	Importanța etiologică
Listeria	*monocytogenes*	Gr. poz., mobil, aerob, cocoid pînă la bastonaşe fine	Listerioză
Erysipelothrix	*insidiosa (rhusiopathiae)*	Gr. poz. (labil), imobil, aerob, talie mijlocie bastonaşe fine, drepte	Rujet, erizipeloidul omului
Bacillus	*anthracis*	Gr. poz., imobil, aerob, sporulat, capsulat bastonaşe cu capetele retezate	Antrax
	larvae	Gr. poz., mobil, aerob, sporulat	Loca americană
	cereus subtilis şi alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, sporulat	Saprofiţi în sol
Clostridium	*septicum* *chauvoei* *novyi/gigas* *botulinum* *tetani*	Gr. poz., mobili anaerobi, sporulaţi, bastonaşe de talie variabilă în general mari	Cărbune paraemfizematos, Cărbune emfizematos, Bradsotul oii, Botulism, Tetanos
	perfringens tipurile A, F şi alte specii	imobil	Enterotoxiemie
Mycobacterium	*tuberculosis* *bovis, avium* *paratuberculosis*	Gr. poz., imobil, aerob, acidorezistent, bastonaşe, polimorfe	Tuberculoza la om şi diferite specii animale Paratuberculoză
Nocardia	*farcinica* *asteroides* şi alte specii	Gr. poz., imobil, aerob, acidorezistent, filamentos	Abcese în piele, pulmon, creier
Actinomyces	*bovis* *israeli*	Gr. poz., imobil, anaerob, miceliform	Actinomicoză
Borrelia	*anserina*	Coloraţie Giemsa sau Tribondeau-Fontana, mobil, anaerob, pînă la 20 microni cu 3–6 spirale	Spirochetoza păsărilor
Treponema	*cuniculi*	Coloraţie Giemsa, mobil, anaerob, pînă la 14 microni lungime, spiralat 14–17 spire	Spirochetoza iepurilor
Leptospira	*icterohaemorrhagiae* *canicola* *pomona* şi alte serotipuri	Coloraţie Giemsa, mobil, aerob, spiralat cu capetele încîrligate	Leptospiroza diferitelor specii animale
Mycoplasma	*gallisepticum* *gallinarum* *hyorhinis* *mastitidis* *pneumoniae* şi alte specii	Coloraţii speciale, cocoizi pînă la pleiomorfi	Boli ale aparatului respirator, mamite, alte procese inflamatorii ale aparatului genital

Anexa 3

Diferențierea unor bacterii Gram pozitive aerobe

Genul	Spori	Mobilitate	Catalază	Oxidază	Glucoză
a) Coci					
Streptococcus	–	–	–	–	+
Micrococcus	–	–	+	–	+(V)
Staphylococcus	–	–	+	–	+
Corynebacterium	–	–	+(V)	–	+
b) bacili					
Listeria	–	+	+	–	+
Erysipelothrix	–	–	–	–	+
Bacillus	+×	+(V)	+	+(V)	+(V)
Lactobacillus	–	–	–	–	+

Legenda : + = pozitiv
– = negativ
+(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție pozitivă
+× = apar și tulpini asporogene

Anexa 4

Diferențierea stafilococilor de micrococi

Caracterul	*Staph. aureus*	*Staph. epidermidis*	*Micrococcus sp.*
Catalază	+	+	+
Reducere nitrați	+	+(V)	V
Testul O F	F	F	O sau –
Hemoliza	+(V)	–(V)	–
Coagulază	+ și (V)	–	–
Lichefierea gelatinei	+	–	V
Manitol	+(V)	–(V)	V

Legenda : O = oxidare
F = fermentare
V = variabil
+(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție pozitivă
–(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție negativă

Anexa 5

Diferențierea principalelor categorii de streptococi

Categoria	Capacitatea de a se dezvolta pe:			
	Agar Mc Konkey	la 45°	Medii cu 6,5% NaCl	Lapte cu 0,1% albastru de metilen
Piogenes	–	–	–	–
Viridans	–	+	–	–
Lactici	–	–	–	+
Enterococi	+	+	+	+

Diferențierea genurilor de Enterobacteriaceae

Genul	Indol	R.M.	VP	Cit	H_2S	Urează	Lact.	Zah.	KCN	Gel.
E. coli	+	+	−	−	−	−	+	V	−	−
Shigella	−(V)	+	−	−	−	−	−×	−×	−	−
Salmonella	−	+	−	V	+(V)	−	−	−	−	−
Citrobacter	−	+	−	+	+(V)	(V)	V	V	+	−
Klebsiella	−(V)	−	+	−	+	+	+	+	−	+
Proteus	V	+	−(V)	V	V	+	−	V	+	V
Providencia	+	+	−	+	−	−	−	V	+	−

Legenda : X = excepție *Shigella sonnei*
RM = mediul roșu metil
VP = reacția Voges Proskauer
Cit = mediul cu citrat

Anexa 7

Identificarea principalelor genuri Gram negative

Genul	OF	M. Konkey	Oxidază	Catalază	Mobilitate	Observații
Enterobacteriaceae	F F F	+ + +	− − −	+ + −	+(V) − −	Vezi anexa 6
Yersinia	F F	+ +	− −	+ +	− +	*Y. pestis* *Y. pseudotuberculosis*
Pseudomonas	O O O	+ + +	+ +(V) −	+ −(V) S	+ + −	*Ps. aeruginosa* *Ps. pseudomalei* *Ps. malei*
Aeromonas	F F	+ +	+ +	+(V) +(V)	+ −	*A. hydrophila* *A. shigelloides* *A. salmonicola*
Pasteurella	F F	− +	+ +	+ +	− −	*P. multocida* *P. hemolytica*
Actinobacillus	F	−	+	+	−	
Bordetella	−	+	+	+	+	*B. bronhiseptica*
Alkaligenes	−	+	+	+	+	*A. faecalis*
Brucella	−	−	+	+	−	
Neisseria	O	−	+	+	−	

Legenda : F = fermentare
O = oxidare
\+ = reacție pozitivă
− = reacție negativă
+(V) = majoritatea tulpinilor dau reacție pozitivă
S = reacție slabă

Anexa 8

Diferențierea principalelor specii de germeni anaerobi Gram negativi

Caracterul	*Sph. necrophorus*	*Bacterioides*		
		melaninogenes	*fragilis*	*serpens*
Mobilitate	–	–	–	+
Indol	+	+	–	–
H_2S	V	+	–	–
Hemoliză	+	+	–	–
Catalază	V	–	V	–
Lichefiere gelatină	–	V	–	+
Glucoză (acidif.)	+	+	+	+
Lactoză	V	+	–	+
Maltoză	+	+	–	+
Zaharoză	+	+	+	–
Manitol	V	+	–	–

Anexa 9

Diferențierea *B. anthracis* de *B. cereus*

Caracterul	*B. anthracis*	*B. cereus*
Mobilitate	–	Obișnuit +
Capsulogeneză	+	–
Salicină (acidifiere)	încet sau –	rapid
Reducerea albastrului de metilen	încet	rapid
Hidroliza gelatinei	încet	rapid
Lapte turnesolat	coagulat și peptonizat încet	coagulat și peptonizat rapid
Hemoliză	– sau f. slabă	adesea puternic hemolitic
Penicilină	obișnuit sensibil	insensibil

Anexa 10

Diferențierea speciilor de Brucella și a biotipurilor lor (OMS)

Specia	Urează	Oxidază	Biotip	Necesar CO_2	H_2S	Dezvoltare pe tionină			Coloranți Fucsină		Aglutinare ser sp. monovalent	
						A	B	C	B	C	A	M
Brucella melitensis	+	+	1	–	–	–	+	+	+	+	–	+
			2	–	–	–	+	+	+	+	+	–
			3	–	–	–	+	+	+	+	+	+
Brucella abortus	+	+	1	+(–)	+	–	–	–	+	+	+	–
			2	+	+	–	–	–	–	–	+	–
			3	–(+)	+	–	–	+	+	+	+	–
			4	+(–)	+	–	–	–	+	+	–	+
			5	–	–	–	+	+	+	+	–	+
			6	–	–	–	+	+	+	+	+	–
			7	–	–/+	–	+	+	+	+	+	+
			8	+	–	–	+	+	+	+	–	+
			9	–/+	+	–	+	+	+	+	–	+

Specia	Urează	Oxidază	Biotip	Necesar CO_2	H_2S	Dezvoltare pe tionină			Coloranți Fucsină		Aglutinare ser. sp. monovalent	
						A	B	C	B	C	A	M
Brucella suis	+	+	1	−	+	+	+	+	−	−	+	−
			2	−	−	−	+	+	−	−	+	−
			3	−	−	+	+	+	+	+	+	−
Brucella ovis	+	+		−/+	−			+		+		
Brucella canis	+	+		−	−			+		+		

Legenda : A = Concentrație 1/25 000
B = „ 1/50 000
C = „ 1/100 000

Anexa 11

Diferențierea speciilor de *Actinomyces*

Caracterul	*A. bovis*	*A. israeli*	*A. nasslundii*	Difteroizi anaerobi
Catalază	−	−	−	+
Hidroliză amidon	+	V	V	−
Reducere nitrat	−	+(V)	+(V)	+(V)
Lichefiere gelatină	−	−	−	(+)
Glucoză (acidif.)	+	+	+	+
Xiloză	−	+(V)	−	−
Rafinoză	−	V	+(V)	V

Anexa 12

Caracterele diferențiale ale unor specii mai importante din genul *Clostridium*

Specia	Mobilitate	Lichef. gelatinei	Nitrat	Indol	Prod. de acid					Urează	Alte caractere
					D	M	L	S	Z		
Cl. perfringens	−	+	+	−	+	+	+	V	+	−	
Cl. septicum	+	+	+	−	+	+	+	+	−	−	iepure sensibil
Cl. feseri	+	+	+	−	+	+	+	(+)	+	−	iepure rezistent
Cl. novi A	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	
Cl. novi B	+	+	+	−	+	V	−	−	−	−	
Cl. hemolyticum	+	+	−	+	+	−	−	−	−	+	
Cl. bifermentans	+	+	−	+	+	+	−	+	−	−	
Cl. botulinum neproteolitic	+	+	−	−	+	V	−	V	V	−	
Cl. botulinum proteolitic	+	+	−	−	−	+	+	V	V	−	
Cl. tetani	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	
Cl. sporogenes	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	
Cl. histolyticum	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	

Legenda : D = dextroză; M = maltoză; L = lactoză; S = salicină; Z = zaharoză

Izolarea unor virusuri animale

Virus	Proba preferată	Sistemul gazdă	Dovada infecției	Identificare
IBR	Tampoane nazale, oculare şi vaginale; trahee, pulmon, rinichi, ficat fetal şi rinichi fetal	Cultura celulară (de origine bovină)	ECP	NV AF
BVD	Tampoane nazale şi fecale, splină, ggl. limf., intestin, leucocite, ţesuturi fetale	Idem	ECP FA	NV AF
PI—3	Tampoane nazale, pulmon	Idem	ECP FA HA	NV FA IHA
Febra catarală malignă (MCF)	Tiroidă	Culturile se fac din celule din ţesuturi suspecte	ECP	NV
ECBO	Tamp. nazale şi fetale	Cult. celulare de orig. bovină	ECP	NV
Adeno bovin	Idem	Idem	ECP	NV
Pesta porcină	Amigdale, splină, ggl. limf.	Cult. celulare (linia PK—15)	AF	AF
Aujeszky	Creier, amigdale, pulmon, rinichi	Idem (inoc. iepuri s.c.)	ECP Prurit	NV AF
TGE porc	Intestin	Cult. primare renale porc	ECP AF	NV AF
ECPO şi Teschen	Tamp. nazale, fecale, creier, intestin	Cult. cel. de orig. porcină	ECP	NV
Adeno porc	Tamp. fecale, nazale	Idem	ECP	NV
Encefalomiocardită	Cord	Şoricel sugar i. cer.	Paralizia tren post. moarte	NV
Rinopneumonie ecvină	Tamp. nazale, sînge	Renale ecvine	ECP	NV
Influenţă ecvină	Idem	Ou embrionat găină cavit. alantoidiană	moarte HA	IHA

Virus	Proba preferată	Sistemul gazdă	Dovada infecției	Identificare
Anemia infecțioasă ecvină	Diagnosticată curent prin test de difuz. în gel (Coggins)	—	—	—
Encefalomielita ecvină (EEE, EEW, VEE)	Creier	Cult. celul. (PK—15 și alte linii). Embrion de găină (diferite căi) șoarece sugar i. cer.	ECP Moarte Afecț. creier și moarte	NV NV NV
Herpes canin	Pulmon, rinichi	Cult. cel. ren. ciine	ECP	NV
Hepatită canină	Ficat, rinichi, pulmon	Idem	ECP	NV AF
Adeno canin	Pulmon	Idem	ECP	NV
Jigodie canină	Pulmon, vezică urinară, cerebel	Idem	AF	AF
Rinotraheită felină	Tamp. nazale, trahee, pulmon	Cult. cel. renale pisică	ECP	NV
Panleucopenie felină (gastroent.)	Intestin	Idem	AF	AF
Variola aviară	Leziuni	Embrion de pui (MCA)	Leziuni variolice	NV
Laringotraheită	Trahee, pulmon	Idem	Lez. focale	NV
Pseudopestă	Pulmon, cord, rinichi splină	Idem (cavit. alant.)	Moarte HA	IHA
Bronșită infecț.	Trahee, pulmon	Idem	Piticire, închircire	NV
Encefalomielită aviară	Creier	Pui de o zi (i. cer.)	Tremurături, moarte	NV
Turbare	Creier	Șoareci sugari	Encefalită și moarte	AF NV

Legendă : ECP = efect citopatic ; NV = neutralizare virus ; AF = anticorp fluorescență ; HA = hemaglutinare ; IHA = inhibarea hemaglutinării

Anexa 14

Diferențierea unor specii din genul *Candida* pe baza caracterelor biochimice

Specia	Bulion Sabouraud	Urează	Fermentarea			
			Glucoză	Maltoză	Zaharoză	Lactoză
C. albicans	Nu se dezvoltă în suprafață	—	AG	AG	AG	—
C. tropicalis	Se dezvoltă în suprafață	—	AG	AG	AG	—
C. pseudotropicalis	Nu se dezvoltă în suprafață	—	AG	—	AG	AG
C. krusei	Se dezvoltă în suprafață	—	AG	—	—	—
C. parapsilopsis	Nu se dezvoltă în suprafață	—	A/AG	—/A	—/A	—
C. guilliermondii	Nu se dezvoltă în suprafață	—	—/AG	—	—/AG	—

Legendă : — = reacție negativă
A = acidifiere
G = producție de gaze
/ = sau

Anexa 15

Diferențierea speciilor din genul *Cryptococcus*

Specia	Ferm. glucozei	Urează	Dezv. 37 °C	Asimilare zaharuri					Asimilare nitrați
				Glucoză	Maltoză	Zaharoză	Lactoză	Galactoză	
C. neoformans	—	+	+	+	+	+	—	+	—
C. albidus	—	+	—	+	+	+	+	+	+
C. albidus var. diffluens	—	+	—	+	+	+	—	+	+
C. luteolus	—	+	—	+	+	+	—	+	—
C. laurentii	—	+	—/+	+	+	+	+	+	—
C. terreus	—	+	—	+		—	—	+	—/+

Anexa 16

Constante fiziologice ale animalelor de laborator

Nr. crt.	Specia	Temperatura normală	Greutatea		Longevitatea
			la fătare	adultului	
1	Șoarecele alb	37—39 °C	1 g	18— 20 g	3,5—4 ani
2	Șobolanul alb	38,5—39,4 °	7 g	120—130 g	3—4 ani
3	Cobaiul	37,5—39,5 °	40—70 g	400—900 g	3—6 ani
4	Hamsterul auriu				$3-3\frac{1}{2}$ ani
5	Iepurele de casă	38,5—39,5 ° (după Marek) 39—40,8 ° (după Wirrh)	50 g	2,5—5 kg	7—8 ani
6	Dihorul	38,3—39,2 °	10 g	1180 g	5—6 ani
7	Păsări	39,5—44 ° (după Marek) 40,5—42 ° (după Wirrh)			

Constantele sanguine la animalele de laborator (după Valeria Bica-Popii şi H. Răducănescu)

Specia	Numărul de globule roşii (milioane)	Hemoglobina (grade Sahli)	Numărul de globule albe (mii)	Formula leucocitară					
				polinucleare neutrofile %	polinucleare eozinofile %	polinucleare bazofile %	limfocite mici %	limfocite mari %	monocite %
Şoarecele alb	6—10	90—97°	5—15	12—50	0,5—5,8	0,3—1	37—48,5	11—15	3—10
Şobolanul alb	4,7—12,6	93,3—100°	5—21—25,7	16—50	1—35	0,2—1	30—53,5	14—24,5	0,5—3,2
Cobaiul	4,5—6	65—95°	8—18	20—45	3—20	0,5—3	32—47	6—15	3—10
Hamsterul auriu	7,5		8—9	32	0,5—1		66		2,5
Iepurele de casă	4—6	50	8—12	30—50	1—3	0,5—3	35—60	2—9	1—4
Dihorul	8,5		8—9	65	1		33		1
Porumbelul	3,5—4,5	79—96°	7,6—16—23,4	26—41	1,5—10	2—10,6	42	13,5	3
Găina	3—4	50—65°	23—35	20—50	2—8	1—5	40—60	5—15	1—4

Constante fiziologice legate de reproducţia animalelor de laborator (după Valeria Bica-Popii şi H. Răducănescu)

Nr. crt.	Specia	Vîrsta la care animalul este apt pentru reproducţie	Durata gestaţiei	Numărul produşilor la o fătare	Numărul fătărilor pe an	Vîrsta separării puilor de mamă
1	Şoarecele alb	3 luni	19—21 zile	4—8	4—5	4 săptămîni
2	Şobolanul alb	3 luni	25—30 zile	4—8	3—4	3 săptămîni
3	Cobaiul	3—4 luni	61—67 zile	2—4	2—3	15—20 zile
4	Hamsterul auriu	3 luni	16—19 zile	4—10	3	3 săptămîni
5	Iepurele de casă	4—7 luni	30—35 zile	3—10	3—5	5 săptămîni
6	Dihorul	4—7 luni	40—42 zile	5—10	1	60 zile

Anexa 19

Rații furajere orientative zilnice pentru animale de laborator (după V a l e r i a B i c a-P o p i i și H. R ă d u c ă n e s c u)

Nr. crt.	Specia	Lapte	Pîine	Ovăz	Morcov	Lucernă	Sfeclă	Fîn	Carne crudă
1	Șoarecele alb	5 g	5 g	5 g	—	—	—	—	
2	Șobolanul alb	15 g	15 g	15 g	5 g	5 g	5 g	—	—
3	Cobaiul	—	—	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	
4	Hamsterul auriu	5— 10 g	5—10 g	10—15 g	10—20 g	—	15— 20 g	10 g	
5	Iepurele de casă	—	—	50 g	—	100—150 g	100—150 g	15—20 g	
6	Dihorul	200—300 g	40—60 g						30—40 g

Anexa 20

Receptivitatea animalelor de laborator față de unele bacterii importante pentru patologia veterinară
(după V a l e r i a B i c a-P o p i i și H. R ă d u c ă n e s c u)

Specia microbiană	Specia animală	Calea de administrare	Rezultatul și durata medie a infecției
Staph. pyogenes	iepure	intravenoasă	1—3 zile
	șobolan tînăr	intravenoasă	24 ore — 5 zile
Str. equi și *Str. zooepidemicus*	șoarece	intraperitoneal	12—48 ore
Escherichia coli	șoarece	intraperitoneal	12—24 ore
Salmonella	șoarece	intraperitoneal subcutan *per os*	24—48 ore 3—21 zile 3—21 zile
Pasteurella multocida	șoarece	subcutan	24—72 ore
Actinobacillus mallei	cobai	intraperitoneal	5—15 zile
Necrobacterium	iepure	subcutan	3—6 zile
Erysipelothrix insidiosa	șoarece porumbel	subcutan intramuscular	4—6 zile 3—6 zile
Listeria monocytogenes	cobai iepure	intraperitoneal conjunctival	3—5 zile 2—3 zile (se vindecă)
M. tuberculosis (toate tipurile)	șoarece	intravenos	20—60 zile
M. tuberculosis tip uman	cobai	subcutan	30—80 zile

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. ADAMEŞTEANU I., NICOLAU A., BÂRZĂ H., 1959, „Semiologie medicală veterinară", Ed. Academiei RSR, Bucureşti.
2. ADERCA I., IANCONESCU M., 1962, „Culturi de celule în inframicrobiologie", Ed. Academiei RSR, Bucureşti.
3. ANDREWES C., 1964, „Viruses of vertebrates", Ed. Bailliere, Tindall and Cox, Londra.
4. BĂIEŞ I., BRAN C., 1971, „Bolile infecţioase ale animalelor domestice", Ed. didactică şi pedagogică, Bucureşti.
5. BĂLBĂIE V., 1964, „Microbiologie — lucrări practice" lito Inst. Med. Farmacie, Bucureşti.
6. BÂRZĂ H., VINŢAN A., PAŞTEA E., CREŢEANU C., MAY I., 1955, „Curs de diagnostic clinic", vol. III, Inst. Agr. Arad.
7. BERBINSCHI C., 1968, „Boala lui Aujeszky", Ed. Agro-Silvică, Bucureşti.
8. BERGEY, 1957, „Manual of determinative bacteriology", Ed. Bailliere, Tindall and Cox, London.
9. BOCH, J., SUPPERER R., 1971, „Veterinärmedizinische Parasitologie", Paul Parey Verlag, Berlin.
10. BONNET H., NÉVOT A., 1964, „Traveaux pratiques de bacteriologie" Ed. Masson, Paris.
11. BUTTIAUX R. ş.a., 1962, „Manuel de techniques bactériologiques", Ed. Méd. Flamarion Paris.
12. CAJAL N., 1959, „Diagnosticul de laborator al inframicrobiozelor umane" Ed. Acad. RSR, Bucureşti.
13. CAJAL N., 1964, „Inframicrobiologie",, în „Metodele laboratorului clinic", Ed. medicală Bucureşti, 921—1013.
14. CAMPBELL D. H., GARVEY J. S., CREMER N. E., SUSSDORF, 1963, „Méthodes in Immunology", Benjamin Inc, New York — Amsterdam.
15. CARTER G. R., 1973, „Diagnostic procedures in veterinary microbiology", Ed. Charles C. Thomas Springfield — Illinois U.S.A.
16. CHRISTOPH H. J., MEYER H, 1968, „Klinisches laboratorium", S. Hirzel Verlag Leipzig.
17. CIUREA V., 1950, „Tehnica de microscopie" curs — lito, Med. Vet. Arad.
18. DUMAS J., 1951, „Bacteriologie medicale", Ed. Flamarion, Paris.
19. EUZEBY J., 1969, „Cours de Mycologie médicale comparée", Vigot-Frères Editeurs, Paris.
20. GASTINEL P., 1957, „Précis de bactériologie medicale" 2-ème Edition, Ed. Masson Paris, 167—174.
21. GUIYON LE R., 1961, „Precis de bactériologie", G. Doin et C. Editeurs Paris.
22. HANKS J. H., 1955, „Nutrition of cells in vitro", in „An introduction to cell and tissue culture", Burgess, Minneapolis.
23. HARRIS R. J., 1964, „Techniques in Experimental virology", Academic Press, London — New-York.
24. HAUPT H., 1964, „Medizinisch-bakteriologische Diagnostik für Ärzte und Tierärzte", F. ENKE Verlag Stuttgart.

25. HENNEBERG G., KÖHLER H., 1961, „Prakticum der virusdiagnostik" Fischer Verlag Stuttgart.
26. HORSFALL F. Jr., TAMM I., 1965, „Viral and Rickettsial Infections of Man", J. P. Lippincott Company, Phyladelphia — Toronto.
27. IONICĂ I., CIORTEA G., MICLEA I. E., 1974, „Tuberculoza animalelor domestice", Ed. Ceres, Bucureşti.
28. LANGERON M., VANBREUSEGHEM R., 1958, „Precis de Mycologie" G. Doin et C. Editeurs, Paris.
29. LENNETTE E. H., SCHMIDT N. J., 1964, „Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases", 3-Ed. Amer. Publ. Hlth Ass., New-York.
30. LESBOUYRIES G., 1965, „Pathologie des oiseaux de bassecours" Vigot Fr. Edit., Paris.
31. LICPERTA E., 1956, „Sulfamidele şi antibioticele în medicina veterinară", Ed. Agro-Silvică, Bucureşti.
32. LINSERT H., SCHIMMEL D., KIELSTEIN, 1970, „Bakteriologisch-serologisches Laboratorium., Mappe 1—2, S. Hirzel Verlag, Leipzig.
33. LUNGU T., MITROIU P., 1971, „Micozele animalelor domestice" Ed. Ceres, Bucureşti.
34. MACKIE J. T., McCARTNER E. J., 1956, „Handbook of practical Bacteriology", 9-th, Edition Livingstone, Edinburgh.
35. MANOLESCU N., 1976, „Citomorfologia măduvei hematoformatoare şi a leucocitoconcentratului la animale", Ed. Ceres, Bucureşti.
36. MELNICK J. L., 1956, „Tissue culture methodes" in „Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases", Amer. Publ. Hlth., N. Y.
37. MERCHANT T. A., PACKER R. A., 1961, „Veterinary bacteriology and virology". Ames Yowa, 63—149, 193—227, 251—669, 704—729.
38. MESROBEANU L., MARX A., STAVRI D., TEODORESCU G., 1961, „Mediile de cultură în bacteriologia medicală", Ed. medicală, Bucureşti.
39. MITROIU P., 1976, „Micoze şi micotoxicoze la animale", Ed. Ceres, Bucureşti.
40. MORGAN J. F., MORTON H. J., PARKER R. C., 1950, „Nutrition on animal celles in tissue culture", Proc. Soc. exp. Biol., N. Y., 73, 1.
41. MOTOC D., 1964, „Microbiologia produselor alimentare", Ed. Tehnică, Bucureşti.
42. MUREŞAN E., GABOREANU M., BOGDAN A. T., BABA A. I., 1974, „Tehnici de histologie normală şi patologică", Ed. Ceres Bucureşti.
43. MUSCAN S., 1974, „Biotest — Handbuch für bakteriologische Untersuchungen". Biotest Serum Institut, Frankfurt a.M.
44. NESTORESCU N., 1961, „Bacteriologie medicală", Ed. medicală Bucureşti.
45. NICOLAU ST. S., 1962, „Elemente de inframicrobiologie generală" Ed. Academiei. Bucureşti.
46. NICULESCU C. T., NICOARĂ S. T., 1966, „Progrese în tehnicile hematologice uzuale", Ed. Medicală, Bucureşti.
47. ONEŢ E., 1975, „Curs de diagnostic de laborator", Lito Inst. Agronomic „Dr. P. Groza" Cluj.
48. OPRESCU C., 1963, „Infecţia cu micobacterii". Ed. Academiei Bucureşti.
49. PAUL I., 1976, „Morfopatologie veterinară", Ed. Ceres, Bucureşti.
50. PAUL J., 1960, „Cell and Tissue culture", 2-Edition, Edinburgh-London.
51. POP AL., ISAC B., 1954, „Bruceloza umană", Ed. medicală.
52. POPA G., STĂNESCU V., 1974, „Controlul sanitar veterinar al alimentelor", Ed. Did. şi Ped., Bucureşti.
53. POPOVICI I., STAMATIN L., 1968, „Bolile infecţioase ale animalelor domestice", Ed. didactică şi pedagogică, Bucureşti.
54. PORTOCALĂ R., IONESCU N. I., 1962, „Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie", Ed. Academiei, Bucureşti.
55. PREVOT A. R., 1961, „Traité de systématique bactérienne", Ed. Dunod, Paris.
56. RĂDUCĂNESCU H., BICA-POPII VALERIA, 1973, „Bacteriologie veterinară aplicată", Ed. Ceres, Bucureşti.
57. RUJANSKA M., 1967, „Rev. med. vet." Pol. 10, 584—587.
58. RUSOV C., PETROVIC P., 1968, „Vet. glasnic".
59. SCHALM O. W., JAIN N. C., CARROL E. J., 1975, „Veterinary Haematology", 3-rd Edition, Lea and Febiger, Philadelphia.
60. STAMATIN N., 1965, „Microbiologie şi imunologie veterinară" Ed. didactică şi pedagogică, Bucureşti.
61. STARKE G., 1968, „Virologische Praxis", VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

62. ȘTOENESCU V., NICULESCU A., 1964, „Bolile păsărilor", Ed. Agro-Silvică, București.
63. TOPLEY — WILSON, 1957, „Principles of bacteriology and immunity", Fourth edition, Edward and Arnold Ed., London.
64. VIOR C., 1962, „Tuberculoza aviară", Ed. Agro-Silvică București.
65. WILDFUHR G., 1959, „Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Epidemiologie", Ed. G. Thieme, Leipzig, 258—280.
66. WILLMER E. N., 1958, „Tissue culture", Wiley, New-York.
67. WINKLE S., 1955, „Mikrobiologische und serologische Diagnostik", 2 Aufl. Fischer Verlag, Stuttgart.
68. WHITBY L., HYNES M., 1956, „Medical Bacteriology", 6-th Ed. Churchill, London.
69. WODROW J. C., 1974, Hematologia, Budapesta.
70. SHILADZE I., 1968, Veterinaria, 3, 27—30.
71. *** 1967, „O.M.S. WHO/TB Techn. Guide, 7,22.
72. *** „Diagnostic microscopique des maladies tropicales" broșură BAYER.
73. *** 1972, „Handbuch der Oxoid-Erzeugnisse für mikrobiologische Zwecke, London.
74. *** 1953, „Difco Manual of dehidrated culture media and clinical laboratory procedures, 9-th Edition, Detroit — Michigan.
75. *** „Handbook of Microbiology, Dehidrated Culture Media, Culture Medium Bases, Sundry Preparations for Microbiology", E. Merk, Darmstadt.
76. *** „Série de Rapports Techniques, Nr. 210: standardisation des tests de sensibilité bactérienne (Deuxième rapport du comité d'experts des antibiotiques OMS), Genève.
77. *** Instrucțiuni tehnice în serodiagnosticul brucelozei la animale, 1971, Ministerul Agriculturii și Silviculturii.
78. *** 1974 „Haury-Test Fortschrit und Erfahrung aus München, Vierte Ausgabe.
79. *** Instrucțiunile Institutului „Dr. I. Cantacuzino" pentru întrebuințarea serurilor aglutinante antisalmonella.
80. *** 1967, Bull. Un. Int. Tub., 39, 17.
81. *** 1962, Bilan Int. Tub., 32, 1, 31.



Redactor: Dr. med. vet. DESPINA TUDOR
Tehnoredactor: MARIA IONESCU

Bun de tipar: 29.08.1978. Apărut: 1978. Tiraj: 3.350 ex. Coli editoriale: 25,05. Coli de tipar: 21,50. C. Z. pentru bibliotecile mari: 636.089 C.Z. pentru bibliotecile mici: 636.

Întreprinderea Poligrafică Cluj
Municipiul Cluj-Napoca, str. Brassai nr. 5—7.
Republica Socialistă România
Comanda nr. 335/1978

